

白泽方, 潘大仁, 霍煜璟, 等. 睾丸酮降解菌的分离鉴定及降解特性 [J]. 福建农业学报, 2014, 29 (7): 698-701.

BAI Z-F, PAN D-R, HUO Y-J, et al. Isolation and Characterisation of a Testosterone-Degrading Bacterium [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 29 (7): 698-701.

## 睾丸酮降解菌的分离鉴定及降解特性

白泽方<sup>1</sup>, 潘大仁<sup>2\*</sup>, 霍煜璟<sup>2</sup>, 李清<sup>1</sup>

(1. 福建农林大学作物科学学院, 福建 福州 350108; 2. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350108)

**摘要:** 为筛选获得具有降解环境雄激素的菌株, 从福建莆田的土壤中分离得到 1 株能够高效降解睾丸酮的菌株, 命名为 C53-20。该菌经过常规的形态和 16S rDNA 序列同源性分析, 鉴定为克雷伯氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumonia*)。该菌在 35~40℃、pH6.0~8.0 具有较高的降解活性, 其最适值分别为温度 37℃ 和 pH6.5。该菌能够以睾丸酮为唯一碳源生长, 12 h 内对 1 mmol·L<sup>-1</sup> 睾丸酮的降解率为 45%。该菌的筛选获得为进一步研究与睾丸酮降解相关的微生物基因提供资源。

**关键词:** 降解菌; 睾丸酮; 16S rDNA

中图分类号: S 182

文献标识码: A

### Isolation and Characterisation of a Testosterone-Degrading Bacterium

BAI Ze-fang<sup>1</sup>, PAN Da-ren<sup>2\*</sup>, HUO Yu-jing<sup>2</sup>, LI Qing<sup>1</sup>

(1. College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350108, China;

2. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

**Abstract:** One bacterium, which has testosterone degradation efficiently, was isolated from the sludge, Fujian and named C53-20. The results of morphological characteristics and the similarity analysis of the 16S rDNA sequence suggest that it is a *Klebsiella pneumonia*. In addition, testosterone degradation activity in 35~40℃ and pH6.0~8.0 range was assayed, and our results suggest that the optimum activity is at 37℃ and pH6.5, respectively. Testosterone can be utilized as sole carbon and energy sources and the degradation rate to cholesterol was 45%, with 1 mmol·L<sup>-1</sup> concentrations within 12 hours. Our results suggest that the strain has potential application prospects in environmental remediation of androgen contaminated areas.

**Key words:** degrading bacteria; testosterone; 16S rDNA

睾丸酮 (Testosterone), 又称睾酮, 是生物体内主要的雄性激素, 主要作用是促进雄性器官和第二性征的发育, 是其衍生物和人工合成雄激素的基础<sup>[1]</sup>, 目前广泛应用于禽畜的养殖和临床药物<sup>[2]</sup>。环境中的雄激素不仅会干扰生物体的内分泌系统, 而且还对微生物群落的结构和功能产生危害<sup>[3~4]</sup>。很多国家和地区的多种环境介质中, 都有环境雄激素检出<sup>[5]</sup>。环境雄激素通过干扰生物体正常的内分泌系统, 对水生生物和哺乳动物的生殖发育产生危害, 而且还会影响微生物群落的结构与功能<sup>[6~8]</sup>。目前, 临床和市场上所用的雄性激素都是

经睾丸酮环形结构基础上进行改造而成的衍生物<sup>[9]</sup>。雄激素在环境中会通过径流和渗滤等途径, 向周围环境和地下迁移, 将污染风险扩大<sup>[6]</sup>。环境中雄激素的降解主要在微生物作用下发生, 而且雄激素在环境样品中的半衰期长达 267 d, 所以非常有必要寻找具有强降解睾丸酮的微生物, 使其可以应用于环境修复<sup>[10]</sup>。本研究通过从环境中取样、富集驯化以及筛选对睾丸酮具有较强降解能力的菌株, 对其进行鉴定以扩大雄激素降解菌的种质资源, 并对其影响条件进行了初步研究, 为其在实际生产中的应用提供理论基础。

收稿日期: 2014-05-03 初稿; 2014-06-08 修改稿

作者简介: 白泽方 (1987-), 男, 在读硕士生, 研究方向: 农业生物技术 (E-mail: xiaobai2006jay@126.com)

\* 通讯作者: 潘大仁 (1949-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农业生物技术 (E-mail: pdr8598@163.com)

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2008J0041)

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

从福建莆田某池塘取4份淤泥作为分离睾丸酮降解菌的材料。LB培养基:蛋白胨 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母膏 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NaCl $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7.0, 固体培养基添加琼脂 $14\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。无机盐培养基:  $(\text{NH}_4)^+$   $\text{H}_2\text{PO}_4$   $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$   $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot7\text{H}_2\text{O}$   $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.0, 固体培养基添加琼脂 $14\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以上培养基 $121^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌30 min。烟碱用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后根据需要添加。睾丸酮(ACROS公司); MJ Mini 48孔梯度PCR仪(BIO-RAD); 高效液相色谱仪(Warters2695); 离心机(Eppendorf Centrifuge 5810R)。

### 1.2 降解菌的富集分离和纯化

将取样的泥土混合后,按照文献[11]的方法进行富集分离。在平板上挑取尽可能多的单菌落适当稀释后分别点在无睾丸酮和含有 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 睾丸酮的无机盐培养基平板上,  $37^\circ\text{C}$ 过夜培养。将可以利用睾丸酮为唯一碳源的菌株重新在稀释10倍含睾丸酮的无机盐平板挑取单菌落。

### 1.3 降解能力的确定

为了筛选降解能力较强的菌株,将培养好的4种菌株的菌液按1%的接种量加入到睾丸酮为唯一碳源的浓度 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的无机盐培养基中,  $37^\circ\text{C}$ ,  $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养12 h, 每隔2 h取 $0.5\text{ mL}$ 的菌液, 加 $1\text{ mL}$ 氯仿抽提, 静置分层后, 取出抽提液吹干, 加 $1\text{ mL}$ 100%色谱甲醇定容后用高效液相测定其睾丸酮的含量。色谱条件为: 流动相甲醇:水=80:20;柱温 $30^\circ\text{C}$ ;流速 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;检测波长 $254\text{ nm}$ 。

标准曲线的制作:用100%甲醇配制睾丸酮标准溶液( $0.01$ ,  $0.05$ ,  $0.1$ ,  $0.3$ ,  $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 分别取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 进行高效液相色谱测定, 条件同上。以峰面积(Au)为纵坐标, 睾丸酮浓度为横坐标( $C$ ,  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )绘制标准曲线。回归方程为:  $y = 724619x + 154633$ ,  $R = 0.9989$ 。

### 1.4 菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列测定

细菌总DNA的提取方法为常规方法。用于PCR反应的引物为通用引物, 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 和 27F: 5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'。PCR反应体系( $50\text{ }\mu\text{L}$ ): Taq酶 $0.5\text{ }\mu\text{L}$  ( $1\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ );  $10\times$

PCR缓冲液 $5.0\text{ }\mu\text{L}$ ; dNTP $1.0\text{ }\mu\text{L}$ ; 模板DNA $1.0\text{ }\mu\text{L}$ ; 引物1492R和27F各 $2.0\text{ }\mu\text{L}$ ; 纯水 $38.5\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR条件:  $94^\circ\text{C}$  3 min;  $94^\circ\text{C}$  1 min,  $61^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  1 min循环30次;  $72^\circ\text{C}$  10 min。PCR产物的纯化和测序由上海博尚生物技术公司完成。测序结果利用Blast在GenBank中进行同源性比较以鉴定。

### 1.5 菌株生长特性的测定

将在LB液体培养基中过夜培养的菌液按1%的接种量接种于含睾丸酮( $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的无机盐培养基中, 在转速为 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床上, 分别以不同pH(pH 6.0~8.0, 梯度0.5, 温度 $37^\circ\text{C}$ )和不同温度( $30\sim42^\circ\text{C}$ , 梯度 $2^\circ\text{C}$ , pH 7)的培养基里培养, 每隔2 h测定细菌的生长情况和培养基中睾丸酮含量, 以确定菌株的生长范围和最适生长条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 降解菌的富集分离和纯化

经富集分离, 筛选到6株可以以睾丸酮为唯一碳源进行生长的细菌(图1), 而在10倍稀释的加睾丸酮无机盐培养基上只有4个菌株能够生长, 分别为: C53-20、C53-25、C53-38、C53-42。将其进行睾丸酮降解能力的确定, 结果发现菌株C53-20的降解能力最强, 其12 h内的降解率为45% (图2)。

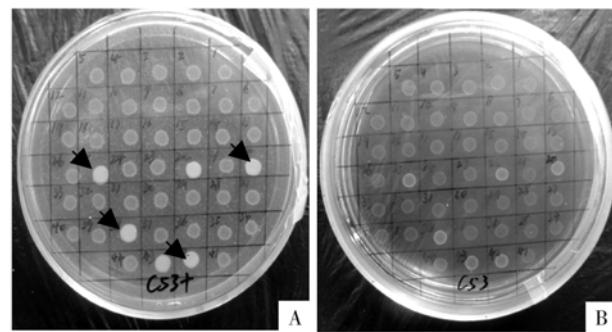


图1 筛选降解睾丸酮的细菌

Fig. 1 Filter bacterial degradation of testosterone

注: A为加睾丸酮的培养基; B为未加睾丸酮的培养基。

### 2.2 菌株 C53-20 的鉴定

生理生化试验结果表明, 菌株C53-20为革兰氏染色阴性, 短杆状, 在牛肉膏蛋白胨琼脂平板上菌落乳白色, 圆形, 表面光滑, 能以睾丸酮为唯一碳源进行生长。根据形态特征初步鉴定为克雷伯氏肺炎菌 *Klebsiella pneumoniae*。

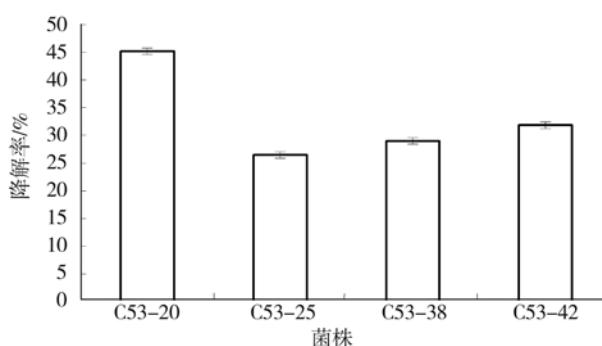


图 2 各菌株睾丸酮降解率

Fig. 2 Degradation of different strains of testosterone

菌株 C53-20 的 16S rDNA 的 PCR 扩增，电泳如图 3。其序列长度为 1 398 bp，在 GenBank 中比对后构建系统发育树进行同源性分析（图 4），结果表明菌株 C53-20 与克雷伯氏肺炎菌 *Klebsiella pneumoniae* 中的多个菌株同源性均达到 99%。结合该菌的形态特征和生理生化性状，最终将 C53-20 菌株鉴定为 *Klebsiella pneumoniae*。

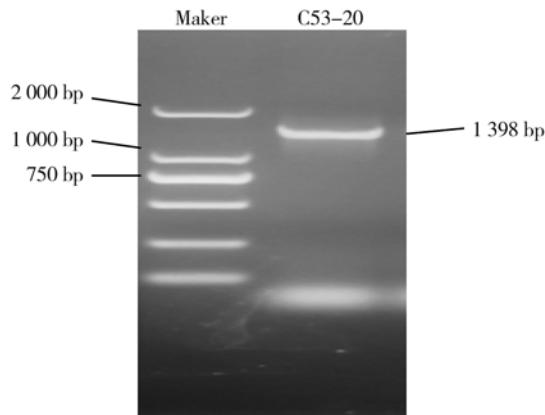


图 3 菌株 C53-20 的 16S rDNA

Fig. 3 16S rDNA of strain C53-20

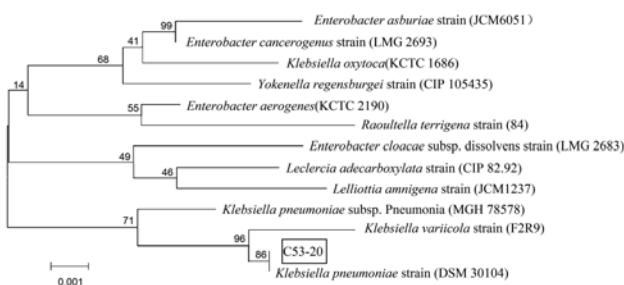


图 4 菌株 C53-20 的系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree of Strain C53-20

### 2.3 菌株 C53-20 对睾丸酮降解特性的研究

通过测定菌株 24 h 内的生长情况和培养基中

睾丸酮含量，结果表明，菌株 C53-20 在 pH 6.0~8.0 菌株生长良好。细胞生长的最适 pH 为 6.5，在该 pH 条件下，C53-20 达到最大的生长量，对睾丸酮的降解率最高。该菌在 30~42℃ 能够生长，其中在 37~40℃ 时生长比较好且差异较小。该菌的最适生长温度为 37℃，在该温度下菌株生长量和睾丸酮降解率都达到最大值。

### 3 讨论与结论

本研究从湖底的污泥中富集筛选出来的具有较强降解睾丸酮能力的菌株 C53-20，能够以睾丸酮作为唯一碳源，通过其 16S rDNA 序列的测定分析，初步鉴定为克雷伯氏菌属，并不是常见的睾丸酮降解菌种类。克雷伯氏菌可以降解甾体雌激素 MHE (3-甲氧基-17 $\beta$ -羟基-1, 3, 5 (10), 8 (9)-雌甾-4 烯)<sup>[12]</sup>，也可以降解拟除虫菊酯类杀虫剂农药，但是通过对比该文献中菌株的生长特性可以判定其与本研究所得到的菌株并非同一种，并且菌株 C53-20 具一定的胆固醇降解能力。甾体雌激素和拟除虫菊酯的化学结构与睾丸酮的化学结构有相似的甾体类环状结构<sup>[13]</sup>，所以可以推断睾丸酮的微生物降解可能是微生物的酶对甾体底物的某一部位进行特定的化学反应来获得一定的产物，降解部位可以从母核或侧链开始，通过脱氢过程最终分解成二氧化碳及水<sup>[14]</sup>。但是与降解相关的关键基因和酶是否相同还有待研究。

研究发现，不同试验批次中相同菌株对睾丸酮的降解能力有一定的差异，说明细菌对睾丸酮的降解能力在一定程度上受其生长情况的影响，但是不同菌株降解能力强弱不变，这也是能够筛选出高效降解菌的必要条件。该研究结果与其他研究者的结果一致<sup>[15~17]</sup>。

### 参考文献：

- [1] 许澜. 雄激素与运动的关系 [J]. 湖北体育科技, 2006, 25 (1): 29~30.
- [2] GALVEZ J I, MORRISON J R. Efficacy of trenbolone acetate in sex inversion of the Blue Tilapia *Oreochromis aureus* [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1996, 27 (4): 483~486.
- [3] 游牧, 李朝品. 环境污染与生物消长的研究进展 [J]. 环境与健康杂志, 2012, (6): 36.
- [4] 吴二社, 张松林, 刘焕萍, 等. 农村环境中内分泌干扰物的现状, 危害及处理 [J]. 中国农学通报, 2011, 27 (14): 282~285.
- [5] 李艳霞, 韩伟, 林春野, 等. 畜禽养殖过程中雌激素的排放及其环境行为 [J]. 生态学报, 2010, 30 (4): 1058~1065.

- [6] 韩伟, 李艳霞, 杨明, 等. 环境雄激素的危害, 来源与环境行为 [J]. 生态学报, 2010, 30 (6): 1594—1603.
- [7] RAKL V, PRITSCH K, MUNCH J C, et al. Structural and functional diversity of microbial communities from a lake sediment contaminated with trenbolone, an endocrine-disrupting chemical [J]. Environmental Pollution, 2005, 137 (2): 345—353.
- [8] KANG I J, YILOTA H, OSHIMA Y, et al. The effects of methyltestosterone on the sexual development and reproduction of adult medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Aquatic toxicology, 2008, 87 (1): 37—46.
- [9] 鲍丽萍, 易凤仙. 现代口服避孕药不良反应研究 [J]. 中国误诊学杂志, 2012, 11 (34): 8350—8351.
- [10] SCHIFFER B, DAXENBERGER A, MEYER K, et al. The fate of trenbolone acetate and melengestrol acetate after application as growth promoters in cattle: environmental studies [J]. Environmental health perspectives, 2001, 109 (11): 1145.
- [11] 喻子牛, 何绍江, 李阜棣. 农业微生物学实验技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 140—142.
- [12] 纪树兰, 韩磊, 任海燕, 等. 一株降解甾体雌激素的克雷伯氏菌 ZY3 [J]. 北京工业大学学报, 2007, 32 (11): 1017—1021.
- [13] 崔建国, 刘亮, 甘春芳, 等. 芳(杂)环甾体化合物的合成及生理活性研究 [J]. 化学进展, 2014, 26 (2/3): 320—333.
- [14] 戴艺民, 周以飞, 陈建秋, 等. 睾丸酮丛毛单胞菌工程菌构建及稳定性分析 [J]. 农业生物技术学报, 2010, 18 (4): 807—814.
- [15] 周玉龙, 李国军, 李阳, 等. 奶牛肺炎克雷伯氏菌的分离与鉴定 [J]. 中国奶牛, 2007, (6): 36—38.
- [16] 李永峰, 任南琪, 杨传平, 等. 16S rDNA 测序快速鉴定废水生物处理系统目标细菌 [J]. 哈尔滨工程大学学报, 2006, 26 (6): 806—810.
- [17] 艾育芳, 潘大仁, 周以飞, 等. 环境中胆固醇降解菌的分离与鉴定 [J]. 中国农学通报, 2011, 27 (18): 139—142.

(责任编辑: 张 梅)