

李玉洁, 张佳鑫, 王彩红, 马桥. *Burkholderia* sp. IDO3对粪臭素的响应及下游代谢基因[J]. 应用与环境生物学报, 2024, 30 (3): 579-585

Li YJ, Zhang JX, Wang CH, Ma Q. Response of *Burkholderia* sp. IDO3 to skatole and downstream metabolic gene analysis [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2024, 30 (3): 579-585

# *Burkholderia* sp. IDO3对粪臭素的响应及下游代谢基因

李玉洁 张佳鑫 王彩红 马桥✉

大连海事大学环境科学与工程学院 大连 116026

**摘要** 粪臭素是一种具有强烈粪臭味的氮杂环芳烃污染物, 广泛存在于动物肠道、粪便、垃圾填埋场和海洋等环境介质中, 较为稳定且难以降解。以*Burkholderia* sp. IDO3为研究对象, 系统研究菌株在粪臭素压力下的生理生化响应, 并利用RT-qPCR和异源表达技术探究下游降解功能基因。结果显示, 粪臭素对*Burkholderia* sp. IDO3最小抑制浓度为1.5 mmol/L; 粪臭素促进菌膜形成和提高菌株表面疏水性, 且呈剂量依赖性。氧化应激实验表明粪臭素提高*Burkholderia* sp. IDO3的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性, 抑制菌株脂质过氧化(丙二醛)以及还原型谷胱甘肽含量。结合前期组学分析推测邻苯二酚1,2-双加氧酶基因(DCN14\_04105)可能为下游代谢关键基因, RT-qPCR实验表明该基因在粪臭素压力下上调3.70倍。将该基因在大肠杆菌中表达并获得纯酶, 结果表明该酶最适pH为8.5, 最适温度为30℃,  $Zn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Se^{4+}$ 、 $Sn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 对其具有抑制作用,  $K_m$ 值为25.98  $\mu\text{mol/L}$ ,  $k_{cat}$ 值为10.70  $s^{-1}$ 。本研究表明粪臭素影响了*Burkholderia* sp. IDO3菌株的生理生化性能, 菌株代谢粪臭素中心代谢途径为邻苯二酚1,2-双加氧酶途径。该结果可为粪臭素的高效降解提供新的微生物资源, 也为粪臭素的功能研究提供参考。(图7表1参30)

**关键词** 粪臭素; 伯克霍尔德菌; 功能响应; 生物降解; 邻苯二酚1,2-双加氧酶

## Response of *Burkholderia* sp. IDO3 to skatole and downstream metabolic gene analysis

LI Yujie, ZHANG Jiabin, WANG Caihong & MA Qiao✉

College of Environmental Science and Engineering, Dalian Maritime University, Dalian 116026, China

**Abstract** Skatole is a nitrogen containing heterocyclic aromatic pollutant with a strong fecal odor. It is widely distributed in intestines, feces, landfills, and marine environments. It is relatively stable and difficult to degrade. *Burkholderia* sp. IDO3 was assessed for physiological and biochemical indices under skatole exposure. Downstream metabolic genes were analyzed using RT-qPCR and heterologous gene expression studies. The minimum inhibitory concentration (MIC) of skatole for *Burkholderia* sp. IDO3 was 1.5 mmol/L. Skatole promotes biofilm formation and hydrophobicity in strain IDO3 in a dose-dependent manner. Oxidative stress experiments revealed that skatole increases superoxide dismutase and catalase activities and inhibits lipid peroxidation (malondialdehyde) and glutathione production. Based on preliminary omics analyses, we speculated that catechol 1,2-dioxygenase (DCN14\_04105) may be the key gene involved in downstream metabolism. RT-qPCR showed that this gene was upregulated 3.70-fold under skatole exposure. The gene was expressed in *Escherichia coli* to obtain pure protein. Pure enzyme experiments revealed an optimal pH of 8.5 and an optimal temperature of 30℃.  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Se^{4+}$ ,  $Sn^{2+}$ , and  $Ca^{2+}$  exhibited inhibitory effects. The  $K_m$  value was 25.98  $\mu\text{mol/L}$ , and  $k_{cat}$  was 10.70  $s^{-1}$ . This study demonstrated the physiological and biochemical properties of *Burkholderia* sp. IDO3 was used to assess the effect of skatole exposure. The central metabolic pathway of skatole degradation is likely catalyzed by catechol 1,2-dioxygenase. These results provide a new microbial resource for efficient skatole degradation, and facilitate functional studies.

**Keywords** skatole; *Burkholderia*; functional response; biodegradation; catechol 1,2-dioxygenase

粪臭素即3-甲基吲哚, 分子式为 $C_9H_9N$ , 分子质量为131.17, 具有粪臭味, 由肠道和环境厌氧微生物代谢色氨酸产生, 是畜禽废弃物中典型的恶臭污染物<sup>[1]</sup>。粪臭素结构稳

定、生物利用性差, 其臭味扩散力强而持久。粪臭素会诱发反刍动物急性肺水肿和肺气肿, 被证明是一种潜在的致癌物, 此外也是猪肉膻味的重要诱因<sup>[2-3]</sup>。粪臭素对各种微生物都有一

收稿日期 Received: 2023-06-05 接受日期 Accepted: 2023-07-28

国家自然科学基金项目(32170121)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (32170121)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: xiaoma0556@dlmu.edu.cn)

定的抑制作用, Tittsler等人测定粪臭素对25种革兰氏阴性肠杆菌的抑菌作用, 发现不同属、种, 甚至同一种的不同株系对粪臭素的耐受性均存在差异<sup>[4]</sup>, 并且粪臭素的抑菌效力大约是吡嗪的两倍。粪臭素还可抑制菌株生物膜的形成, 可能导致细胞表面受损<sup>[5]</sup>。粪臭素的抑菌作用可能是粪臭素产生菌争夺资源占领生态位的武器。然而, 目前关于粪臭素的大多数研究集中于其环境检测和生物除臭等方面, 粪臭素对微生物的效应研究及其对生态的影响关注较少。

作为一种典型的环境污染物, 粪臭素能抑制甚至杀死微生物, 同时部分微生物也能降解粪臭素。粪臭素好氧降解研究开始于1953年, Proctor对假单胞菌降解吡嗪乙酸的过程进行研究, 率先证明了粪臭素是中间代谢物, 并提出吡嗪乙酸降解途径为吡嗪乙酸—粪臭素—吡嗪酚—水杨酸—邻苯二酚<sup>[6]</sup>。Fujioka等人于1968年报道了一株革兰氏阳性菌能催化粪臭素发生氧化反应<sup>[7]</sup>。2005年, Gu等人筛选到一株粪臭素降解菌株*Pseudomonas aeruginosa* Gs, 但其降解速度有限<sup>[8]</sup>。2010年, Li等人分离出另一种可降解粪臭素的假单胞菌*Pseudomonas putida* LPC24, 其在微氧条件下30 d内能去除2.0 mmol/L粪臭素, 并生成产物3-甲氧基吡嗪、甲酰氨基苯乙酮和2-氨基苯乙酮<sup>[9]</sup>。2014年Sharma等人从动物垃圾泻湖中分离出一株*Rhodopseudomonas palustris* WKU-KDNS3, 该菌72 h内可去除约0.1 mmol/L的粪臭素, 降解粪臭素能力较低<sup>[10]</sup>。2015年, Fukuoka等人对粪臭素代谢产物中羟基粪臭素进行质谱分析, 推测菌株代谢粪臭素可能生成的产物, 发现粪臭素代谢与吡嗪生物转化途径有所不同<sup>[11]</sup>。2019年Tesso等人从鸡粪便筛选到*Acinetobacter* sp. NTA1-2A和TAT1-6A具有粪臭素降解能力<sup>[12]</sup>。2022年, Hu等人筛选得到*Acinetobacter oleivorans*菌株并对降解中间产物进行了分析<sup>[13]</sup>。近期Ye等人获得能够降解粪臭素的好氧和兼性厌氧菌群, 并对菌群结构和降解产物进行初探<sup>[14]</sup>。与此同时, 本课题组利用宏基因组和宏转录组技术探究了好氧菌群降解粪臭素的功能菌株及功能基因, 并从中筛选得到一株粪臭素降解菌*Rhodococcus* sp. DMU1, 进一步利用基因组测序、转录组测序、RT-qPCR和基因异源表达技术揭示了黄素单加氧酶和邻苯二酚双加氧酶可能参与粪臭素降解过程, 为粪臭素生物降解提供新的见解<sup>[15-16]</sup>。

综上, 粪臭素的生物学功能研究较少, 其生物降解研究虽持续不断, 但都集中于菌株的筛选、降解特性研究及可能降解产物的分析, 生物降解功能基因鲜见报道。本实验室前期筛选得到一株吡嗪降解细菌*Burkholderia* sp. IDO3, 发现其可以利用粪臭素作为唯一碳源生长。生物强化实验表明菌株IDO3能提高活性污泥去除粪臭素的能力并且成功定殖于活性污泥中成为优势菌<sup>[17]</sup>。我们利用转录组学技术对菌株IDO3降解粪臭素过程进行了解析, 发现粪臭素可影响菌株能量代谢及多种氧化还原酶基因的表达<sup>[17]</sup>。在此基础上, 我们进一步对菌株IDO3在粪臭素压力下的菌体响应及中心代谢功能基因进行研究, 以期揭示粪臭素对微生物的生物学效应及其代谢途径, 为粪臭素的生态功能和环境行为研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及培养基

实验所用菌株为前期从活性污泥筛选得到的粪臭素高效降解菌株*Burkholderia* sp. IDO3、克隆宿主菌*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、大肠杆菌表达宿主菌*E. coli* BL21(DE3)、表达质粒pET-28a(+).

LB培养基(g/L): 酵母粉5 g, 蛋白胨10 g, 氯化钠10 g, 溶于水(ddH<sub>2</sub>O)。无机盐培养基(g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 16.4 g, 溶于ddH<sub>2</sub>O中, 加入1 000  $\times$ 金属离子溶液1 mL, 用时稀释5倍。MSY液体培养基(g/L): 0.2 g酵母浸粉溶于无机盐培养基。PBS缓冲液(g/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.16 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3.34 g, 配置成50 mol/L的PBS(pH 7.0)。所有培养基均于121  $^{\circ}$ C灭菌20 min备用。结晶紫溶液(0.1%): 0.1 g结晶紫溶于100 mL ddH<sub>2</sub>O。萘酚溶液: 0.2 g萘酚溶于100 mL浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中, 现用现配。

### 1.2 主要试剂

粪臭素(3-甲基吡嗪), 购自阿拉丁, 化学纯。基因重组酶C113、2  $\times$  Phanta Max Master Mix(P515)、2  $\times$  Taq Max Master Mix、基因组提取试剂盒(DC103-01)、质粒提取试剂盒(DC201-01)、胶回收试剂盒(DC301-01)均购于南京诺唯赞生物科技有限公司。引物合成与测序在上海生工生物工程有限公司进行。

### 1.3 菌株培养与菌悬液制备

从固体平板中挑取单菌落, 培养于LB培养基中作为实验所用种子液。将种子液以1%接种量接种于新鲜LB培养基中, 培养至对数生长期, 离心机离心(6 800 r/min、4  $^{\circ}$ C、5 min), 收集菌体, 用PBS洗涤两次, 重悬使菌液OD<sub>620</sub>为0.4。

### 1.4 粪臭素对菌株最小抑制浓度测定

在无菌超净台中, 在96孔板中每孔加入180  $\mu$ L含粪臭素的培养液, 18  $\mu$ L菌液(按照1:10接种), 培养基中加入与粪臭素等量DMSO培养菌株作为对照组, 12个重复组, 封口膜密封, 30  $^{\circ}$ C静置培养, 每间隔4 h用酶标仪测定OD<sub>620</sub>。

### 1.5 菌膜形成量的测定

在96孔板中培养菌株至特定时间, 移除菌液, 每孔加入200  $\mu$ L PBS洗涤并吸净, 重复3次, 置于室温风干。再向每孔加入200  $\mu$ L 0.1%结晶紫溶液, 染色30 min, 重复PBS洗涤操作, 最后加入95%乙醇洗脱30 min, 置于酶标仪测定OD<sub>570</sub>, 菌膜形成量绝对值为OD<sub>570</sub>; 菌膜形成相对值采用均一生物量处理OD<sub>570</sub>/OD<sub>620</sub>。

### 1.6 菌株胞外聚合物EPS含量的测定

胞外聚合物提取: 采用化学法对菌株胞外聚合物提取, 从种子液中按1%接种量接种于新鲜含不同浓度粪臭素的LB培养基中, 30  $^{\circ}$ C、150 r/min振荡培养过夜, 离心机离心收集菌体并用PBS溶液洗涤两次, 重悬各组菌液, 调节菌液OD<sub>620</sub>值为1.0。取6 mL重悬菌液加入6 mL乙二胺四乙酸溶液, 4  $^{\circ}$ C静置3 h, 离心取上清用于之后含量测定。胞外蛋白含量采用BCA试剂盒进行测定。胞外多糖含量采用萘酚法进行测定。

### 1.7 菌株疏水性能的测定

菌株在含不同浓度粪臭素的LB培养基中过夜生长至对数期, 离心收集菌体并用PBS溶液洗涤两次后重悬, 作为对照悬液管, 测定OD<sub>620</sub>值, 即为A<sub>c</sub>。取1 mL各组重悬液加入0.6 mL二甲苯中, 作为微生物测定管, 各组测定管涡旋30 s, 所有样品置于室温下孵育30 min, 移去下层水层, 测定OD<sub>620</sub>值, 即为A<sub>b</sub>。微生物测定管A<sub>b</sub>和对照悬液管A<sub>c</sub>的吸光度之比即为菌株表面疏水度, 具体公式为疏水度=(A<sub>c</sub>-A<sub>b</sub>)/A<sub>c</sub> $\times$ 100%。

### 1.8 菌株氧化应激实验测定

超氧化物歧化酶(SOD)能够催化超氧阴离子自由基歧化生成O<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 在微生物体内氧化与抗氧化平衡中起重要作用<sup>[18]</sup>。过氧化氢酶(CAT)是一种细胞内抗氧化酶, 将对细胞产生较高危害的过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)催化分解为水和氧气, 防止细胞氧化损伤<sup>[19]</sup>。还原型谷胱甘肽(GSH)是细胞中最重要的抗氧化剂疏基化合物, 能够保护细胞免受氧化损伤<sup>[20]</sup>。氧自由



基作用于脂质的不饱和脂肪酸,生成过氧化脂质,可抑制免疫功能,过氧化脂质可被分解为丙二醛(MDA)<sup>[21]</sup>.测定方法如下:将菌株IDO3从种子液中接种于LB培养基和含不同浓度粪臭素LB培养基中,30℃、150 r/min培养至对数生长期,低温离心收集菌体,用PBS溶液洗涤重悬并进行细胞破碎,之后将破碎液进行低温离心,取上清液即为待测样品.取样品进行测定,按照CAT、SOD活性分析试剂盒、GSH、MDA含量检测试剂盒说明书,进行相关酶活性及含量测定.

1.9 细胞粗酶实验及实时定量PCR检测

将菌株培养至对数生长期,加入粪臭素进行诱导培养4 h,置于离心机中低温离心收集菌体,并用PBS缓冲液洗涤,重悬液置于细胞破碎仪进行破碎,离心后所得上清即为粗酶液.实验中通过观察邻苯二酚在260 nm波长下吸光值的变化,判断菌株IDO3是否能将其降解,进而初步判定中心代谢途径是否为邻苯二酚途径.粗酶实验反应体系为20 μL邻苯二酚(100 mmol/L)、134 μL Na<sub>2</sub>EDTA(20 mmol/L)、1 806 μL PBS(50 mmol/L)和40 μL粗酶液,总体积为2 mL.将反应体系置于35℃反应10 min,利用紫外分光光度计进行全光谱扫描.

将IDO3分别接种到含粪臭素和不含粪臭素的MSY液体培养基中,每组3个平行,过夜培养至菌株对数生长期,置于离心机中进行离心收集菌体,条件为4℃、10 000 r/min,3 min.按照RNA提取试剂盒说明书进行RNA的提取,利用NanoDrop 2000超微量分光光度计测定提取RNA的浓度及质量分析.取1 μg的总RNA,按照RNA逆转录试剂盒说明书配制体系将总RNA逆转录为cDNA.设计荧光定量PCR引物序列(表1),内参基因为菌株IDO3的16S rRNA基因,按照SYBR-qPCR试剂盒说明书配制反应体系,实时定量PCR条件如下:95℃ 10 min;95℃ 15 s,62℃ 1 min,40个循环;95℃ 15 s,65℃ 30 s.

1.10 邻苯二酚1,2-双加氧酶异源表达及酶活特性研究

根据基因序列设计基因表达引物(表1),利用试剂盒提取菌株IDO3基因组,以菌株IDO3 DNA为模板,采用PCR技术对目的基因片段进行扩增,琼脂糖电泳检测并胶回收目的片段,用基因重组酶连接目的片段和载体pET-28a(+),并热击转化到*E. coli* DH5α感受态细胞中,接种至含卡那霉素的LB固体平板进行筛选.将正确菌株转接至新鲜LB培养基中进行扩增培养并提取质粒,得到含有邻苯二酚1,2-双加氧酶的重组质粒并转化到*E. coli* BL21(DE3)中.

将构建成功的大肠杆菌异源表达菌株接种于含卡那霉素的LB液体培养基中,培养至OD<sub>620</sub>达到0.4时,加入0.05 mol/L的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),过夜诱导培养.将菌液进行低温离心收集菌体,并用PBS缓冲液洗涤,重悬20 mL,将重悬液置于细胞破碎仪进行破碎,并将破碎液进行低温高速离心,粗酶液用Ni-NTA进行纯化,对已纯化的邻苯二酚1,2-双加氧酶进行酶学性质测定,包括酶催化的最适pH、最适反应温度、金属离子影响及酶反应动力学参数.反

应体系(1.5 mL)包括15 μL邻苯二酚(100 mmol/L)、67 μL Na<sub>2</sub>EDTA(20 mmol/L)、1 415 μL缓冲溶液、3 μL纯酶.pH值选取范围在6.0-11.0,缓冲溶液为柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0-6.0)、磷酸盐缓冲液(pH 6.0-8.0)、Tris-HCl缓冲液(pH 8.0-9.0)和碳酸盐缓冲液(pH 9.0-11.0),其浓度均为50 mmol/L.测定最适温度时,反应缓冲液采用上述测定的最适pH值的缓冲液,测定温度测定范围在20-60℃.选取Zn<sup>2+</sup>、Se<sup>4+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Sn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>等8种金属离子,测定金属离子对酶活性影响,金属离子浓度均为1 mmol/L,在测定的最适温度及pH条件下进行反应.酶反应动力学参数测定:在最适反应条件下,分别测定体系中含有0.1-1.0 mmol/L邻苯二酚时酶反应速率,根据米氏方程作底物浓度-反应速率关系图,并计算出K<sub>m</sub>值;k<sub>cat</sub>值使用V<sub>max</sub> = k<sub>cat</sub>[E]计算,其中[E]为酶的总浓度(mol/L).利用Origin 9.1绘制相关曲线及柱形图.

2 结果与分析

2.1 粪臭素对菌株IDO3最小抑制浓度及菌膜形成量的影响

粪臭素对菌株IDO3最小抑制浓度结果显示,溶剂DMSO对IDO3生长无影响,粪臭素浓度为0.1 mmol/L时就显示出对菌株生长的轻微抑制作用,且随着粪臭素浓度升高,抑制作用增强,呈明显的剂量依赖性.当浓度大于等于1.5 mmol/L时,完全抑制菌株的生长(图1A).采用结晶紫染色法对菌膜形成量绝对值进行测定(图1B),粪臭素浓度升高对菌膜形成量绝对值有一定作用,但由于粪臭素浓度对菌株生长有较大抑制作用(图1C),采用均一生物量处理(OD<sub>570</sub>/OD<sub>620</sub>)评估粪臭素对菌膜形成量的影响(图1D),与对照组未添加粪臭素进行培养的菌株相比,溶剂DMSO对菌膜形成量无影响,粪臭素促进IDO3菌膜形成,在32-48 h范围内,随着培养时间的延长和粪臭素浓度升高,促进作用也增强.

2.2 粪臭素对菌株胞外聚合物含量及疏水性能的影响

胞外聚合物含量检测结果如图2A所示,与对照组相比,DMSO不影响菌株胞外蛋白和多糖的含量,0.1和0.5 mmol/L的粪臭素不影响菌株胞外蛋白含量,但当浓度达到0.75 mmol/L时,可显著促进菌株胞外蛋白的分泌,其含量可高达800 mg/L.总的来说,当粪臭素浓度达到0.75 mmol/L时,促进菌株胞外聚合物分泌,主要是促进菌株胞外蛋白的分泌,这说明高浓度的粪臭素影响菌株胞外蛋白分泌及代谢响应.细胞表面疏水性是指由细菌表面抵抗水分子黏性而引起的吸附力,疏水性和细胞膜结构、生物分子表面特性和化学成分相关.疏水性能测定结果显示,随着粪臭素浓度增大菌株疏水性能逐渐增强,粪臭素促进菌株表面疏水性(图2B).

2.3 不同浓度粪臭素对菌株氧化应激的影响

与对照组相比,添加0.1、0.5、0.75 mmol/L粪臭素可极显著促进菌株体内SOD酶活性,且随浓度升高,促进作用增强

表1 本研究所用引物  
Table 1 Primers used in this study

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列(5'-3')<br>Primer sequence(5'-3')     | 用途<br>Usage                    |
|---------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|
| 16S-qF              | CCTTGTCCTTAGTTGCTA                        | 荧光定量 Fluorescence quantitation |
| 16S-qR              | CTGTTCCGACCATGTAT                         | 荧光定量 Fluorescence quantitation |
| DCN14_04105-qF      | CACATCTGGGACGACTTC                        | 荧光定量 Fluorescence quantitation |
| DCN14_04105-qR      | GTCCTGCTTGTCCTTGAG                        | 荧光定量 Fluorescence quantitation |
| DCN14_04105-F       | CAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAACAAACAAGCCATCGA | 克隆表达 Cloning and expression    |
| DCN14_04105-R       | CTGGTGCTGGTGGTCTCGAGTCAGGCCTGTGCACGCGCC   | 克隆表达 Cloning and expression    |

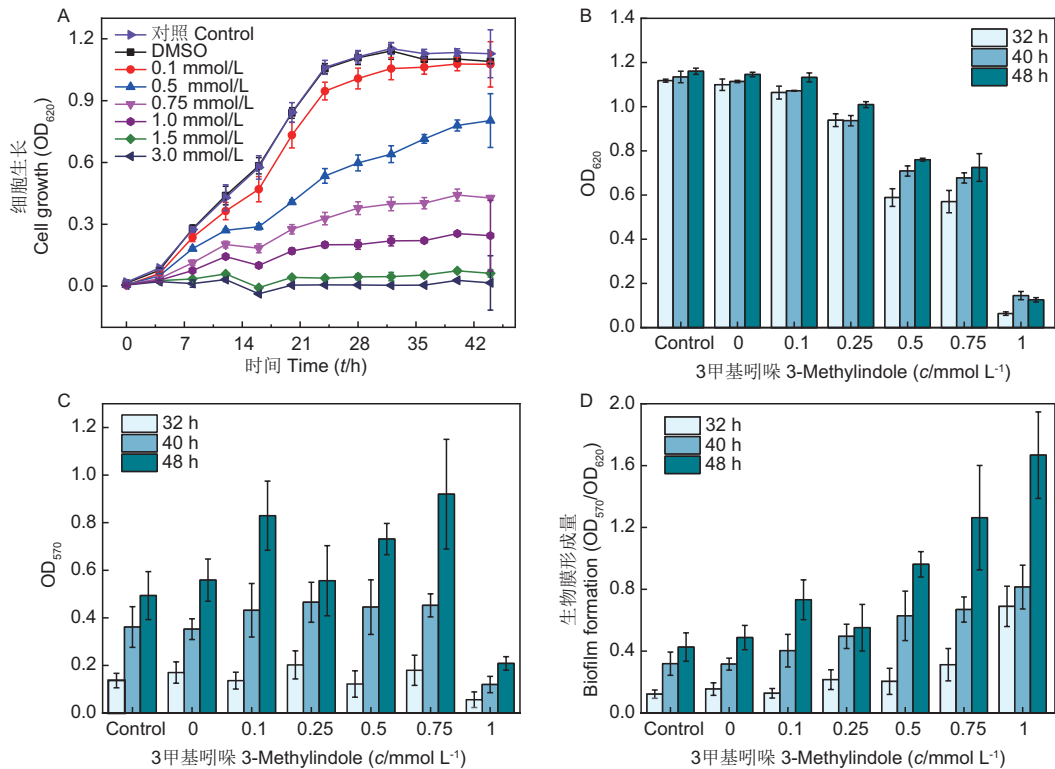


图1 粪臭素对菌株生长量及菌膜形成量影响。A: 生长曲线; B: 生长量; C: 菌膜形成量绝对值; D: 菌膜形成量相对值。

**Fig. 1** The effects of skatole on bacterial strain growth and biofilm formation. A: Growth curve; B: Growth amount; C: Absolute value of biofilm formation; D: Relative value of biofilm formation.

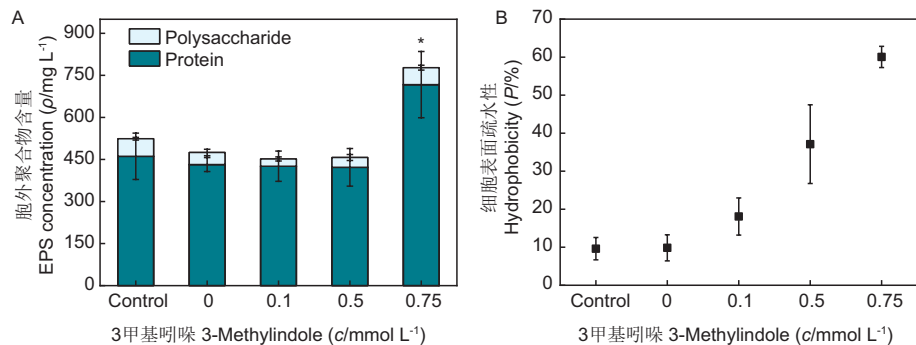


图2 菌株胞外聚合物及疏水性测定结果。A: 胞外聚合物; B: 疏水性。\*  $P < 0.05$ 。

**Fig. 2** Results of extracellular polymeric substances (EPS) and hydrophobicity. A: Extracellular polymeric substances; B: Hydrophobicity. \*  $P < 0.05$ .

(图3A)。CAT活性结果显示, 与对照组相比, 添加0.1 mol/L粪臭素可极显著抑制CAT酶活性, 但0.5和0.75 mmol/L粪臭素可极显著促进菌株CAT酶活性(图3B)。GSH含量测定结果显示, 与对照组相比, 低浓度粪臭素(0.1、0.5 mmol/L)对菌株GSH含量无明显影响, 0.75 mmol/L粪臭素可显著抑制菌株GSH含量(图3C)。MDA含量结果显示, 与对照组相比, 0.1 mol/L粪臭素对菌株MDA含量无明显影响, 0.5和0.75 mmol/L粪臭素显著抑制菌株MDA含量(图3D)。

#### 2.4 菌株降解粪臭素中心代谢途径的确定

转录组数据表明, 菌株IDO3中心代谢酶邻苯二酚1,2-双加氧酶(DCN14\_04105)可能为中心降解途径关键酶, 通过测定IDO3对邻苯二酚的降解能力, 对中心代谢途径进一步验证, 结果发现, 加入粗酶液反应后邻苯二酚吸收峰发生偏移, 证明菌株IDO3可以转化邻苯二酚, 初步推测*Burkholderia* sp. IDO3降解粪臭素中心代谢途径为邻苯二酚途径(图4A)。邻苯二酚1,2-双加氧酶基因(DCN14\_04105)经诱导后相对转

录表达量为3.70(图4B), 与对照组相比显著上调表达, 证明该基因参与了菌株IDO3降解粪臭素过程。将邻苯二酚1,2-双加氧酶基因(DCN14\_04105)命名为C12O。

#### 2.5 邻苯二酚1,2-双加氧酶基因的克隆与表达

利用PCR技术成功获得目的基因, 经基因重组技术获得重组体(图5A), 其PCR验证产物如图5A所示。利用镍柱纯化获得该基因表达的纯蛋白, SDS-PAGE电泳分析蛋白的大小如图5B所示, 计算邻苯二酚1,2-双加氧酶的蛋白质分子量为 $34.63 \times 10^3$ , 验证大小正确。

#### 2.6 邻苯二酚1,2-双加氧酶纯酶酶学性质

对纯蛋白特性进行研究, 包括pH稳定性、热稳定性、金属离子影响以及酶反应动力学参数。pH稳定性测定结果显示: 该酶在pH值在6.0-11.0范围内均有活性, 在pH为8.5时酶活性最高, 而当pH低于7.0和高于9.0时, 纯酶活力显著降低。实验中还发现不同的缓冲体系对纯酶酶活也具有影响, 在pH同为9.0时, 纯酶在碳酸盐缓冲溶液中酶活性高于Tris-HCl缓冲液

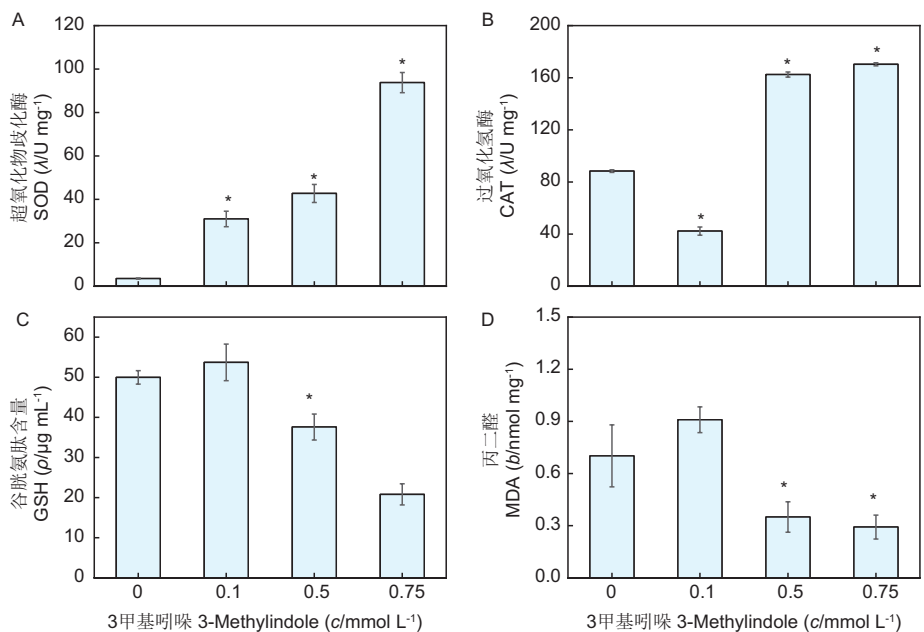


图3 氧化应激反应测定结果。A: SOD酶活性; B: CAT酶活性; C: GSH含量; D: MDA含量。\*  $P < 0.05$ 。  
Fig. 3 Results of oxidative stress reaction. A: SOD activity; B: CAT activity; C: GSH concentration; D: MDA concentration. \*  $P < 0.05$ .

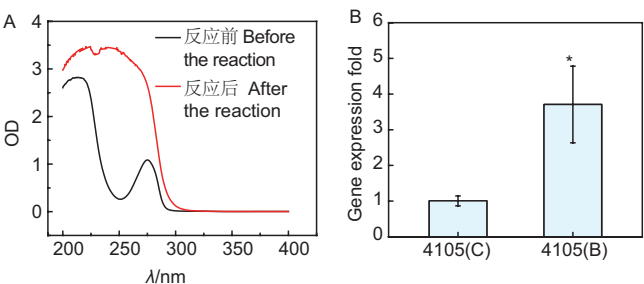


图4 邻苯二酚加氧酶酶活及基因表达验证。A: 菌株粗酶中邻苯二酚加氧酶酶活测定; B: 邻苯二酚-1,2-双加氧酶编码基因的转录表达量。4105(C)为对照组, 4105(B)为实验组。\*  $P < 0.05$ 。  
Fig. 4 Enzyme activity and gene expression of the catechol oxygenase. A: Catechol oxygenase activity in the crude enzyme of strain; B: The expression of catechol 1,2-dioxygenase gene. 4105(C) was the control group and 4105(B) was the experimental group. \*  $P < 0.05$ .

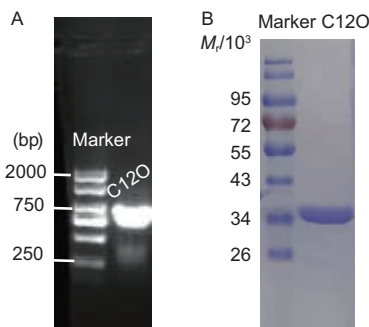


图5 邻苯二酚1,2-双加氧酶基因扩增与蛋白纯化。A: 琼脂糖DNA电泳; B: SDS-PAGE电泳。  
Fig. 5 Gene expression and purification of the catechol 1,2-dioxygenase. A: DNA electrophoresis; B: SDS-PAGE electrophoresis.

(图6A)。热稳定性测定结果显示: 该酶在20-35 °C下具有较高酶活性, 最适温度为30 °C, 在低于5 °C和高于40 °C时失去活性(图6B)。同时, Zn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Se<sup>4+</sup>、Sn<sup>2+</sup>对酶活均具有抑制作用, 其他的金属离子对酶活性无明显影响(图6C)。

根据以上实验结果, 选定pH为8.5的Tris-HCl缓冲液, 在

温度为30 °C条件下测得邻苯二酚1,2-双加氧酶对不同浓度底物催化的反应速率, 根据米氏方程拟合曲线, 得出邻苯二酚1,2-双加氧酶(C12O)  $K_m$ 值为25.98 μmol/L,  $k_{cat}$ 值为10.70 s<sup>-1</sup>(图6D)。

### 3 讨论

吲哚类化合物源于色氨酸的生物转化, 近年来受到越来越多的重视, 特别是吲哚和吲哚乙酸作为跨界、种间和种内信号分子物质, 其功能研究方兴未艾。已有研究表明, 吲哚作为一种细胞内及细胞间的信号分子, 一方面能够抑制菌株群体感应和致病因子的产生, 另一方面也作为重要调节因子, 影响菌株的氧化应激反应<sup>[22-23]</sup>。而吲哚类化合物如吲哚-3-乙酸(IAA), 也可以作为信号分子, 参与植物-微生物的相互作用, 在许多植物相关微生物中, IAA可抑制植物防御反应、促进植物疾病发展和植物生长<sup>[24]</sup>。粪臭素是色氨酸生物转化的终产物之一, 在人体肠道、粪便和环境中广泛存在, 而关于该化合物的生物功能和生物转化研究关注不足, 仍有很多问题悬而未决<sup>[1, 25]</sup>。本研究表明在粪臭素压力下, 菌株通过增加生物膜形成量以及细胞表面疏水性, 增强对外界不利环境的抵抗。之前已有研究表明, 多种污染物对不同菌株的生物膜有促进作用, 菌株也利用这种机制来抵抗抗生素<sup>[26-27]</sup>。2022年, 张琦等人发现在贫营养、酸性和碱性条件下均会使细胞疏水性下降<sup>[28]</sup>; 2021年, Qing等人发现当C6-HSL浓度从0 μmol/L增加到50 μmol/L时, 表面疏水性从24.4%下降到13.4%<sup>[29]</sup>。较高的细胞表面疏水性通常会导致更高的黏附性, 在我们的研究结果中, 粪臭素会促进菌株IDO3的细胞表面疏水性, 提高细胞黏附力, 这也与我们生物膜实验的结果相一致。

粪臭素氧化应激实验结果表明, 粪臭素可显著提高菌株SOD酶活性, 表明粪臭素刺激菌株体内产生超氧阴离子, 菌株增强分泌SOD酶以清除这种影响, 适应高浓度粪臭素环境。CAT酶活性结果显示0.1 mmol/L粪臭素对菌株CAT具有抑制作用, 可能是该菌在暴露粪臭素之前具有较高水平的CAT



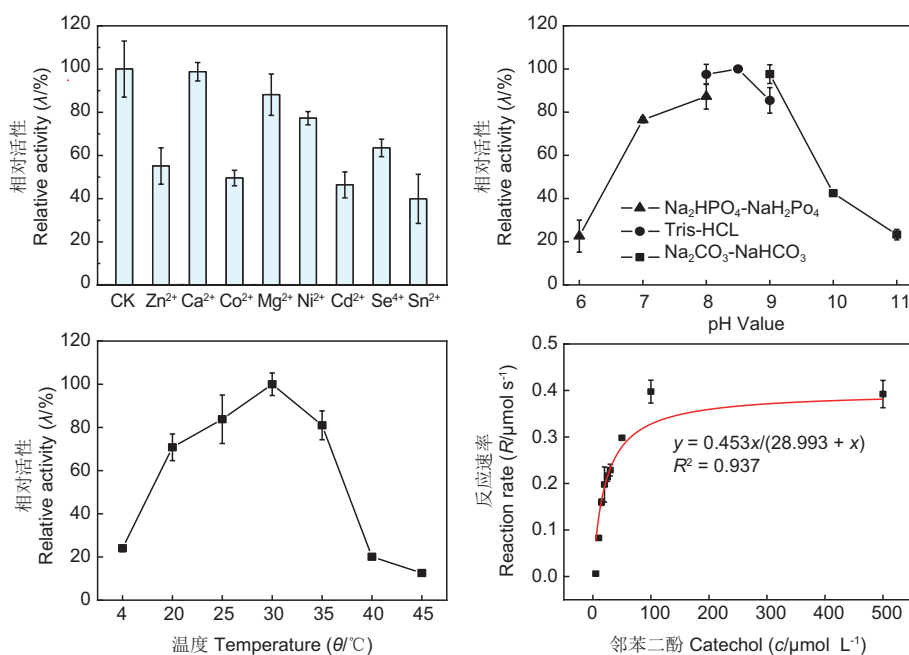


图6 邻苯二酚1,2-双加氧酶活性特性研究. A: pH影响; B: 温度影响; C: 金属离子影响; D: 底物浓度-反应速率关系.

Fig. 6 Enzyme activity characteristics of catechol 1,2-dioxygenase. A: Effect of pH; B: Effect of temperature; C: Effect of metal ions; D: Relationship between substrate concentration and reaction rate.

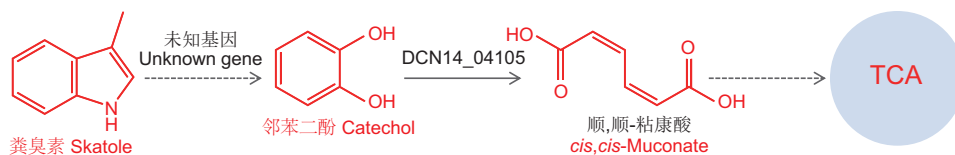


图7 推测的菌株IDO3代谢粪臭素途径.

Fig. 7 Proposed skatole metabolic pathway in strain IDO3.

活性, 0.1 mmol/L粪臭素对菌株具有毒害作用, 影响CAT酶活性, 随着粪臭素浓度增大, 菌株适应机制增强, CAT酶活性升高. 粪臭素压力下, 菌株GSH含量升高, 可能是高浓度粪臭素消耗菌株体内GSH含量, 引起菌株体内氧化应激反应增强, 以适应环境. MDA含量测定实验显示, 当MDA含量浓度大于等于0.5 mmol/L, 菌株体内MDA含量反而更少. 这表明菌株虽受到对粪臭素影响产生氧化应激反应, 但并未对机体造成氧化损伤. 可能是由于菌株对粪臭素的快速降解, 使得菌体受到氧化应激损伤程度也减小. 上述实验结果表明添加粪臭素可引起细菌的氧化应激, 控制细胞氧化还原平衡产生活性氧和激活随后的清除活性, 共同保护细胞免受损伤.

粪臭素生物转化的研究虽然已有数十年, 但大多数研究都集中在菌株的筛选和降解条件优化, 至今其转化机制和途径仍不明确<sup>[1]</sup>. Gu等人证实厌氧条件下菌群转化粪臭素, 降解第一步产物为3-甲基吲哚酮<sup>[30]</sup>, Fujioka等人发现一株吲哚降解菌好氧条件下催化粪臭素, 生成2-氧-3-甲基-3-羟基吲哚<sup>[7]</sup>, 其他粪臭素代谢产物均为推测结构. 此外, 粪臭素生物降解的功能基因仍旧是一个黑匣子. 在1953年, Proctor对假单胞菌好氧条件下降解吲哚乙酸的过程研究发现, 吲哚乙酸可通过粪臭素-吲哚酚-水杨酸-邻苯二酚途径, 进入最终代谢<sup>[6]</sup>, 表明邻苯二酚是粪臭素降解的可能代谢产物. 本课题组前期对粪臭素压力下*Burkholderia* sp. IDO3进行转录组测序, 结果显示与对照组相比, 邻苯二酚1,2-双加氧酶基因DCN14\_04105上调, 倍数为4.79<sup>[17]</sup>. 因此本研究选择这个基因DCN14\_04105开展研究, 对菌株降解粪臭素中心代谢途径进行探索, RT-qPCR结果进一步证实该基因显著上调表

达, 而酶学实验证明该酶能催化邻苯二酚, 因此我们推测菌株IDO3遵循邻苯二酚1,2-双加氧酶代谢途径(图7). 本课题组前期通过驯化活性污泥获得一个能高效降解粪臭素的菌群, 通过耦合宏基因组和宏转录组学分析发现邻苯二酚双加氧酶在菌群中得到富集和上调表达, 推测菌群代谢粪臭素的主要中心途径为邻苯二酚途径<sup>[15]</sup>. 与此同时, 我们还筛选得到一株革兰氏阳性菌*Rhodococcus* sp. DMU1, 对其降解粪臭素的途径进行探究, 也发现该菌下游途径可能为邻苯二酚1,2-双加氧酶途径<sup>[16]</sup>. 基于此, 我们推测邻苯二酚途径可能是粪臭素生物降解的主要且广泛存在的中心代谢途径.

## 4 结论

本研究以粪臭素降解菌*Burkholderia* sp. IDO3为研究对象, 对菌株响应及降解粪臭素机制进行初步探索. 结果表明粪臭素对菌株生长具有抑制作用, 粪臭素可促进生物膜形成, 提高细胞表面疏水性, 高浓度的粪臭素还可促进菌株胞外聚合物的分泌. 粪臭素刺激下, 细菌的SOD和CAT酶活性升高, 表明粪臭素对菌株造成一定氧化压力, 而菌株IDO3可通过降解粪臭素来降低粪臭素的影响. 利用RT-qPCR和基因异源表达实验证明粪臭素下游降解功能基因可能为邻苯二酚1,2-双加氧酶, 该途径是多种芳烃生物降解的下游通路, 具有一定普适性, 但上游降解功能基因至今尚未揭示. 本研究为粪臭素的生物学功能提供新的思考, 同时为阐明粪臭素的生物转化机制和环境行为提供参考. 未来可围绕粪臭素对非粪臭素降解菌的影响及粪臭素完整代谢通路开展深入研究.

## 参考文献 [References]

- 1 Ma Q, Meng N, Li Y, Wang J. Occurrence, impacts, and microbial transformation of 3-methylindole (skatole): a critical review [J]. *J Hazard Mater*, 2021, **416**: 126181
- 2 Carlson JR, Yokoyama MT, Dickinson EO. Induction of pulmonary edema and emphysema in cattle and goats with 3-methylindole [J]. *Science*, 1972, **176** (4032): 298-299
- 3 Nichols WK, Mehta R, Skordos K, Mace K, Pfeifer AM, Carr BA, Minko T, Burchiel SW, Yost GS. 3-methylindole-induced toxicity to human bronchial epithelial cell lines [J]. *Toxicol Sci*, 2003, **71** (2): 229-236
- 4 Tittsler RP, Sandholzer LA, Callahan ET. The bacteriostatic action of skatole on Gram-negative enteric bacilli [J]. *J Infect Dis*, 1935, **57**: 57-60
- 5 Choi SH, Kim Y, Oh S, Chun T, Kim SH. Inhibitory effect of skatole (3-methylindole) on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894 biofilm formation mediated by elevated endogenous oxidative stress [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2014, **58** (5): 454-461
- 6 Proctor MH. Bacterial dissimilation of indoleacetic acid: a new route of breakdown of the indole nucleus [J]. *Nature*, 1958, **181** (4619): 1345
- 7 Fujioka M, Wada H. The bacterial oxidation of indole [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1968, **158** (1): 70-78
- 8 Yin B, Gu JD. Aerobic degradation of 3-methylindole by *Pseudomonas aeruginosa* Gs isolated from mangrove sediment [J]. *Hum Ecol Risk Assess*, 2006, **12** (2): 248-258
- 9 Li P, Tong L, Liu K, Wang Y. Biodegradation of 3-methylindole by *Pseudomonas putida* LPC24 under oxygen limited conditions [J]. *Fresenius Environ Bull*, 2010, **19** (12): 238-242
- 10 Sharma N, Doerner KC, Alok PC, Choudhary M. Skatole remediation potential of *Rhodopseudomonas palustris* WKU-KDNS3 isolated from an animal waste lagoon [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2015, **60** (3): 298-306
- 11 Fukuoka K, Ozeki Y, Kanaly RA. Aerobic biotransformation of 3-methylindole to ring cleavage products by *Cupriavidus* sp. strain KK10 [J]. *Biodegradation*, 2015, **26** (5): 359-373
- 12 Tesso TA, Zheng A, Cai H, Liu G. Isolation and characterization of two *Acinetobacter* species able to degrade 3-methylindole [J]. *PLoS ONE*, 2019, **14** (1): e211275
- 13 Hu H, Li L, Gao F, Diao W, Ma H, Feng F, Quan S, Xiang L, Zhang X. Screening, identification, and degradation characteristics of 3-methylindole degrading bacteria [J]. *Front Environ Sci*, 2022, **10**: 2183
- 14 Ye J, Fu Q. Screening of skatole-degrading bacteria and control of human fecal odor by compound bacteria [J]. *Ann Microbiol*, 2023, **73** (1): 1-14
- 15 Ma Q, Meng N, Su J, Li Y, Gu J, Wang Y, Wang J, Qu Y, Zhao Z, Sun Y. Unraveling the skatole biodegradation process in an enrichment consortium using integrated omics and culture-dependent strategies [J]. *J Environ Sci*, 2023, **127**: 688-699
- 16 Li Y, Ma Q, Zhang J, Meng N, Su J, Wang J. Transcriptomic profiling reveals the molecular responses of *Rhodococcus aetherivorans* DMU1 to skatole stress [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, **249**: 114464
- 17 Ma Q, Qu H, Meng N, Li S, Wang J, Liu S, Qu Y, Sun Y. Biodegradation of skatole by *Burkholderia* sp. IDO3 and its successful bioaugmentation in activated sludge systems [J]. *Environ Res*, 2020, **182**: 109123
- 18 Seo SW, Kim D, Szubin R, Palsson BO. Genome-wide reconstruction of OxyR and SoxRS transcriptional regulatory networks under oxidative stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655 [J]. *Cell Rep*, 2015, **12** (8): 1289-1299
- 19 Fasnacht M, Polacek N. Oxidative stress in bacteria and the central dogma of molecular biology [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, **8**: 671037
- 20 Kalpage HA, Bazylianska V, Recanati MA, Fite A, Liu J, Wan J, Mantena N, Malek MH, Podgorski I, Heath EI, Vaishnav A, Edwards BF, Grossman LI, Sanderson TH, Lee I, Huttemann M. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis [J]. *FASEB J*, 2019, **33** (2): 1540-1553
- 21 Sazykin IS, Sazykina MA, Khmelevtsova LE, Seliverstova EY, Karchava KS, Zhuravleva MV. Antioxidant enzymes and reactive oxygen species level of the *Achromobacter xylosoxidans* bacteria during hydrocarbons biotransformation [J]. *Arch Microbiol*, 2018, **200** (7): 1057-1065
- 22 韩茵, 孙苗苗, 王建平, 祁自忠. 吡啶作为细菌细胞间信号分子的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, **42** (4): 736-748 [Han Y, Sun M, Wang J, Qi Z. Progress on indole: an intercellular signal molecule in microbial communities [J]. *Microbiol Chin*, 2015, **42** (4): 736-748]
- 23 Lee J, Wood TK, Lee J. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule [J]. *Trends Microbiol*, 2015, **23** (11): 707-718
- 24 Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2007, **31** (4): 425-448
- 25 Liu D, Wei Y, Liu X, Zhou Y, Jiang L, Yin J, Wang F, Hu Y, Nanjarajurs AN, Liu Y, Ang EL, Zhao S, Zhao H, Zhang Y. Indoleacetate decarboxylase is a glycyl radical enzyme catalysing the formation of malodorous skatole [J]. *Nat Commun*, 2018, **9** (1): 4224
- 26 Lee J, Attila C, Cirillo SL, Cirillo JD, Wood TK. Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence [J]. *Microbiol Biotechnol*, 2009, **2** (1): 75-90
- 27 曲媛媛, 戴春晓, 张旭旺, 马桥. 吡啶: 种间及跨界信号分子新成员[J]. 生物工程学报, 2019, **35** (11): 2177-2188 [Qu Y, Dai C, Zhang X, Ma Q. A new interspecies and interkingdom signaling molecule—indole [J]. *Chin J Biotechnol*, 2019, **35** (11): 2177-2188]
- 28 张琦. 酸碱和营养条件引起的环境适应性改变对沙门氏菌在多孔介质中迁移的影响[D]. 沈阳: 沈阳大学, 2022 [Zhang Q. Effects of environmental adaptations induced by acid-base and nutrient conditions on migration of *Salmonella migration* in porous media [D]. Shenyang: Shenyang University, 2022]
- 29 Feng Q, Luo L, Chen X, Zhang K, Fang F, Xue Z, Li C, Cao J, Luo J. Facilitating biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* via exogenous N-Acy-L-homoserine lactones stimulation: regulation on the bacterial motility, adhesive ability and metabolic activity [J]. *Bioresour Technol*, 2021, **341**: 125727
- 30 Gu JD, Berry DF. Metabolism of 3-methylindole by a methanogenic consortium [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58** (8): 2667-2669