

## 研究报告

## 粪臭素高效降解菌 YKSW-6 的分离、鉴定及降解特性

张宗源, 周留柱, 岳丹丹, 郭文阳, 潘梦诗, 亓兰达, 王雪妍, 徐宏光, 陈国参, 张英涛\*

河南省科学院生物研究所, 河南 郑州 450000

张宗源, 周留柱, 岳丹丹, 郭文阳, 潘梦诗, 亓兰达, 王雪妍, 徐宏光, 陈国参, 张英涛. 粪臭素高效降解菌 YKSW-6 的分离、鉴定及降解特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2486-2499

Zhang Zongyuan, Zhou Liuzhu, Yue Dandan, Guo Wenyang, Pan Mengshi, Qi Landa, Wang Xueyan, Xu Hongguang, Chen Guocan, Zhang Yingtao. Isolation, identification and characterization of a skatole-degrading bacterial strain YKSW-6[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2486-2499

**摘要:**【背景】粪臭素是畜牧堆肥中有机污染物的主要成分, 造成养殖场及周边环境恶化, 粪臭素污染问题亟待解决, 利用微生物降解粪臭素是一种环保节能的有效方法。【目的】分离鉴定粪臭素高效降解菌株, 研究其降解特性, 为粪臭素降解提供高效的菌种资源, 为该菌株应用于臭味污染环境的净化提供基础。【方法】以粪臭素为唯一碳源的无机盐培养基作为培养基, 从猪粪堆肥样品中分离筛选粪臭素高效降解菌株, 通过形态特征和 16S rRNA 基因序列分析进行分离菌株的初步鉴定, 分析其生长规律及粪臭素降解特性, 并利用气相色谱质谱联用(GC-MS)对菌株代谢粪臭素的产物进行分析。【结果】从样品中分离获得一株能以粪臭素为唯一碳源的细菌 YKSW-6 菌株, 形态学和 16S rRNA 基因序列分析初步鉴定该菌株为戈登氏红球菌(*Rhodococcus gordoniae*)。接种量为 10% 时, 该菌培养 14 h 对 100 mg/L 的粪臭素降解率达到 100%。其能够利用 D-山梨醇、溴-丁二酸等 18 种碳源, 对亚碲酸钾、溴酸钾等 13 种化学敏感物具有抗性。菌株 YKSW-6 在 5% 接种量、温度 30–42 °C 和 pH 值为 6.0–9.0 时对 100 mg/L 的粪臭素降解效率均能达到 100%, 菌株生长和降解粪臭素的最佳条件为: pH 7.2, 温度 37 °C, 转速 180 r/min。GC-MS 结果表明, 粪臭素在菌株的作用下 C2 先被氧化, 转变为 3-甲基羟基吡啶, 随后进一步被氧化为 N-(2-乙酰基苯基)甲酰胺。同时中间产物还有苯乙醛和苯乙酸。【结论】红球菌 YKSW-6 为目前已报道的降解粪臭素能力较强的菌株, 丰富了粪臭素降解菌种的资源库, 为实际环境微生物修复应用提供了理论参考。

**关键词:** 粪臭素; 生物降解; 戈登氏红球菌; 代谢机理

基金项目: 河南省科学院科研开发专项(200305007, 200305002); 河南省重点研发与推广专项(212102110176)

Supported by: Scientific Research and Development Project of Henan Academy of Sciences (200305007, 200305002); Key Research and Development and Promotion Project of Henan Province (212102110176)

\*Corresponding author: E-mail: 13837125910@163.com

Received: 2021-10-28; Accepted: 2021-11-30; Published online: 2021-12-29

## Isolation, identification and characterization of a skatole-degrading bacterial strain YKSW-6

ZHANG Zongyuan, ZHOU Liuzhu, YUE Dandan, GUO Wenyang, PAN Mengshi, QI Landa, WANG Xueyan, XU Hongguang, CHEN Guocan, ZHANG Yingtao\*

Institute of Biology, Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450000, Henan, China

**Abstract:** [Background] Skatole is the main component of organic pollutants in livestock compost, which can cause the deterioration of farms and surrounding environment. Therefore, skatole pollution needs to be solved urgently. [Objective] This study aims to isolate, identify and characterize an efficient skatole-degrading bacterial strain to provide an efficient strain for the degradation of skatole and lay a foundation for the application of this strain to the remediation of odor-polluted environments. [Methods] Using the minimal salt medium with skatole as the only carbon source, we isolated an efficient skatole-degrading strain from a pig manure compost sample. Strain YKSW-6 was identified based on morphological characteristics and 16S rRNA gene sequence, and its growth pattern and skatole degradation characteristics were analyzed. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was employed to analyze the intermediates of skatole degradation. [Results] Strain YKSW-6 was identified as *Rhodococcus gordoniae*. When the strain was inoculated at a ratio of 10%, the degradation rate for 100 mg/L skatole reached 100% within 14 h. This strain can utilize 18 carbon sources such as D-sorbitol and bromosuccinic acid, and was resistant to 13 chemicals such as potassium tellurite and potassium bromate. YKSW-6 completely degraded skatole in the culture medium at 5% inoculum ratio, 30–42 °C, and pH 6.0–9.0. The strain showed the best growth and skatole degradation performance at pH 7.2, 37 °C and 180 r/min. The GC-MS results showed that skatole was firstly oxidized at C2 to 3-methyloxindole, and then oxidized to N-(2-acetylphenyl)formamide by strain YKSW-6. Phenylacetaldehyde and phenylacetic acid were also the intermediates during the degradation. [Conclusion] Strain YKSW-6 is a *Rhodococcus* strain with strong skatole-degrading ability among the reported strains, which enriches the resource of skatole-degrading strains. The results provide a theoretical basis for the development and application of this strain.

**Keywords:** skatole; biodegradation; *Rhodococcus gordoniae*; metabolic mechanism

恶臭对动物和人类健康及环境的负面影响在近几十年里受到越来越多的关注<sup>[1]</sup>。随着经济的发展, 畜牧、水产养殖业快速发展, 在满足居民对肉、蛋、奶需求的同时, 大量排放的粪污与恶臭却愈演愈烈。随之而来的是公众对恶臭投诉的不断增加, 恶臭治理已经成为畜禽、水产养殖、垃圾处理厂和污水处理厂行业面临的主要挑战<sup>[2]</sup>。

3-甲基吲哚(3-methylindole, 3MI, C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N), 俗称粪臭素, 是一种典型的氮杂环芳香化合物。其可溶于有机溶剂, 难溶于水, 具有双环结构, 是色氨酸的主要代谢产物之一, 属于吲哚衍生物<sup>[3]</sup>。粪臭素是一种存在于动物粪便、甜菜根、蜜腺樟木、煤焦油中的天然物质, 也是合成食品添加剂、农用化学品和工业化学品的重要前体。在人类和动物的肠道和粪便、猪粪、活性

污泥、市政和工业废水以及水产养殖水中检测到相当数量的粪臭素<sup>[2]</sup>。粪臭素被认为是畜禽排放的三大有害臭味物质之一,具有强烈的粪臭气味,嗅阈值低于 0.003 mg/m<sup>3</sup>,在浓度极低的情况下仍可被人和畜禽感知<sup>[4-5]</sup>。除了恶臭之外,粪臭素会对人和动物健康造成伤害:可引起牛羊急性肺水肿和肺气肿<sup>[6]</sup>;引起人神经内分泌功能和免疫功能病变,具有呼吸道细胞致畸致癌风险<sup>[7-8]</sup>;粪臭素还被认为是一种吸引蚊子、苍蝇和甲虫的诱食剂,可促进昆虫传播疾病<sup>[9]</sup>。因此,解决粪臭素环境污染具有重要意义。

目前采取的物理、化学法去除粪臭素有一定的效果,但这些方法大都成本高、能量消耗大、易形成二次污染<sup>[10]</sup>。微生物降解技术因其经济、环保的优点而得到越来越广泛的研究。从 1968 年 Fujioka 等<sup>[11]</sup>发现某革兰氏阳性细菌能够将粪臭素氧化为 2-oxo-3-甲基-3-羟基吡啶开始,关于粪臭素降解细菌的报道很多<sup>[12-13]</sup>,如厌氧环境下马来提名梭菌(*Clostridium malenominatum*) A-3<sup>[14]</sup>,硫还原条件下产甲烷菌群<sup>[15]</sup>和氧限制条件下恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) LPC24<sup>[16]</sup>等,好氧菌如乳酸菌(*Lactobacillus brevis*)<sup>[17]</sup>、沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*) WKU-KDNS3<sup>[18]</sup>、不动杆菌(*Acinetobacter toweneri*) NTA1-2A 和(*Acinetobacter gullouiae*) TAT1-6<sup>[19]</sup>、伯克霍尔德菌(*Burkholderia* sp.) IDO3<sup>[20]</sup>、红球菌(*Rhodococcus* sp.) DMU1<sup>[21]</sup>和 *Rhodococcus pyridinivorans* Rp3<sup>[13]</sup>等。现报道的菌株或是对高浓度粪臭素降解率作用有限、培养周期较长,或是只能降解低浓度的粪臭素,与高效去除粪臭素的要求还有一定的差距,还需筛选效率更高的菌株应用于生产。

本文从猪粪堆肥土壤中分离筛选获得粪臭素降解菌株 YKSW-6,并研究其对粪臭素的降

解能力,以及在不同培养条件下(接种量、温度、pH 值、盐度、转速、初始粪臭素浓度)该菌对粪臭素的降解效果及生长性能,并利用 GC-MS 对粪臭素代谢途径及其中间产物进行分析,以期为粪臭素降解提供高效的菌种资源,为该菌株应用于臭味污染环境的净化提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种来源

菌种由河南省中牟某猪厂猪粪堆肥场地的土壤样品中分离筛选获得。

#### 1.1.2 培养基

用于菌株筛选和降解实验的培养基配方见参考文献[22],无机盐培养基(g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 3.38, FeCl<sub>3</sub> 0.000 25, 自然 pH; 用于菌株斜面、种子液、扫描电镜观察实验的 LB 培养基(g/L): NaCl 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, pH 7.0 (固体培养基补加琼脂 15.0 g/L); 磷酸盐缓冲液(PBS) (g/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 10.75, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.34, pH 7.0。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

分析纯粪臭素,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;粪臭素标准品,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;色谱纯甲醇, Tedia 公司;分析纯无水乙醇、25%戊二醛和 NaCl, 国药集团化学试剂有限公司。高效液相色谱仪和气相色谱质谱联用仪, Agilent 公司;紫外分光光度计,上海美谱达公司;基因扩增仪,赛洛捷克公司;扫描电子显微镜,日立公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 粪臭素母液的制备

粪臭素 0.5 g 溶于 100 mL 无水乙醇中,配制成 5 g/L 的粪臭素。用 0.2 μm 的有机滤膜过

滤除菌, 置于 4 °C 冰箱备用。

### 1.2.2 粪臭素降解菌的分离和筛选

称取采集的猪粪堆肥土壤 0.1 g, 用含有 100 mg/L 粪臭素的无机盐培养基于 30 °C、180 r/min 进行驯化, 3 d 为一个驯化周期, 按照 5% 的接种量接种于新鲜的含有粪臭素的无机盐培养基中, 连续驯化约 4–5 个周期。然后取驯化后的样品反复涂布于含有粪臭素的分离平板上, 最后分离得到一株能以粪臭素为唯一碳源生长的菌株, 命名为 YKSW-6, 接种于斜面培养基 4 °C 保存。

### 1.2.3 菌体形态的观察

用扫描电子显微镜观察菌株 YKSW-6 的细胞形态。样品预处理方法如下所述: 取 2 mL 菌液, 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 菌体沉淀用 PBS 清洗 3 次后, 用 5% 戊二醛溶液重悬, 固定过夜; 然后用乙醇梯度脱水(30%、50%、70%、90%、95%、100%); 最后在 9 000 r/min、4 °C 条件下离心 20 min, 待上机观察。

### 1.2.4 菌株 YKSW-6 的 Biolog 分析和 16S rRNA 基因序列测定

Biolog 分析: 将分离得到的纯菌挑到 IF-A 接种液中, 配制成指定浓度的菌悬液, 将菌悬液按每孔 100  $\mu$ L 的量加到 Gen III 板后孵育, 分别培养 24 h、48 h 后用 Biolog 全自动微生物鉴定仪分析读板<sup>[23]</sup>。

YKSW-6 菌株的 16S rRNA 基因 PCR 扩增引物采用通用引物 27F (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 1540R (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 基因组 DNA 2  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L, 2 $\times$ Taq PCR Mix 25  $\mu$ L, 纯化水 19  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 90 s, 38 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物送北京擎科生物科技有限公司测序后在 NCBI 网站上

将序列信息与 GenBank 中已知序列进行比对, 使用 MEGA 7.0 软件通过邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树, 对菌株进行鉴定, 并将序列信息上传至 NMDC 数据库。

### 1.2.5 粪臭素的测定

称取粪臭素标准样品 10 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 用乙醇配制成 1 mg/mL 标准储备液。依次稀释, 得到 0、1、5、10、15、20、25  $\mu$ g/mL 标准系列溶液, 经 0.2  $\mu$ m 有机滤膜过滤, HPLC 测定其峰面积, 每个浓度重复测定 3 次。以进样浓度和所得峰面积建立线性回归方程。

色谱条件: 色谱柱为 Hypersill BDSC18 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5  $\mu$ m); 柱温: 室温; 紫外检测波长: 254 nm; 流动相为甲醇:水(85:15, 体积比); 流速为 1 mL/min; 进样量 20  $\mu$ L。

### 1.2.6 菌株 YKSW-6 生长降解曲线的测定

探究了接种量分别为 1%、5%、10% 条件下, 菌株 YKSW-6 在 100 mg/L 粪臭素为唯一碳源的无机盐培养基中生长和降解情况。培养条件为 180 r/min、自然 pH、30 °C, 每 2 h 取样, 利用紫外-可见分光光度计在 600 nm 处测定吸光度( $OD_{600}$ ), 表征菌株的生长情况。同时对样品进行萃取和液相分析, 以测定粪臭素的浓度。

粪臭素提取: 将上述培养液加入等体积甲醇, 5 000 r/min 离心 10 min, 吸取 1 mL 溶液, 0.22  $\mu$ m 有机滤膜过滤, 4 °C 保存, 待测。如提取液浓度太高, 需进行稀释后再进行 HPLC 检测。检测条件同 1.2.5。

### 1.2.7 不同环境因素对菌株 YKSW-6 降解粪臭素的影响

探究不同环境因素对菌株降解粪臭素的影响, 其中无机盐培养基本条件为粪臭素浓度 100 mg/L、温度 30 °C、摇床转速为 180 r/min、自然 pH、接种量 5%, 定时取样测定该菌株的生长情况( $OD_{600}$ )及培养基中剩余粪臭素的浓

度,以粪臭素去除率作为考察目标。粪臭素去除率(%)=(未接种的培养基中粪臭素含量-已接种的培养基中粪臭素含量)/未接种的培养基中粪臭素含量 $\times$ 100。

分别探究温度、pH、转速对菌株降解粪臭素的影响。不同温度:20、25、30、37、42 $^{\circ}$ C;不同pH:4.0、5.0、6.0、8.0、9.0及自然pH 7.2;不同转速:0、60、120、180、240 r/min,取样时间为28 h。

探究NaCl含量对菌株生长及粪臭素降解的影响,NaCl含量分别为0%、3%、6%、9%、12%、15%,取样时间为28 h。

探究不同浓度粪臭素对菌株生长及粪臭素降解的影响,粪臭素含量为50、100、150、200、300 mg/L,取样时间为28 h。

### 1.2.8 菌株 YKSW-6 降解粪臭素的产物分析

在菌株降解粪臭素28 h后,取200 mL降解液浓缩,加入5 mL丙酮提取。提取液过滤后使用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)进样分析。检测条件:载气为高纯氦气(99.999%),载气流速:1 mL/min,样品量:2  $\mu$ L,分流比:1:1,柱温:70 $^{\circ}$ C起始,10 $^{\circ}$ C/min升至280 $^{\circ}$ C,保持5 min。色谱柱为毛细管色谱柱HP-5MS(30 m $\times$ 250  $\mu$ m $\times$ 0.25  $\mu$ m)。质谱条件为EI电离源,离子源温度230 $^{\circ}$ C,四级杆150 $^{\circ}$ C,接口温度280 $^{\circ}$ C。

## 2 结果与分析

### 2.1 粪臭素降解菌的分离筛选和鉴定

#### 2.1.1 形态学特征

经过反复平板涂布,分离得到一株能以粪臭素为唯一碳源生长的菌株,命名为YKSW-6。菌株YKSW-6在LB固体培养基上的菌落形貌光滑凸起、有光泽、色泽呈橙色,边缘呈放射状、湿润。扫描电镜下菌株YKSW-6呈球状、

短杆状两种不同形态,长度约0.9–1.2  $\mu$ m,无鞭毛。

#### 2.1.2 Biolog 分析和 16S rRNA 基因序列扩增与分析

YKSW-6菌株对Biolog微孔板碳源与化学敏感物质利用情况如表1和表2所示:培养24 h时其可代谢碳源有D-山梨醇、D-甘露醇、D-阿拉伯醇等16种,当延长培养至48 h时可代谢的碳源增加至18种,多了甘油和 $\alpha$ -D-葡萄糖。在培养过程中对亚硝酸钾、溴酸钾等13种化学物质具有抗性。因为实际的废水和被污染的土壤是混杂多种污染物的开放环境,所以通过考察YKSW-6对碳源的利用情况及对化学物的敏感性对其实际应用场景具有参考意义。从表1中可知该细菌可利用多种碳源进行生长,而且对多种化学敏感物具有抗性(表2)。孵育48 h时,Biolog微生物鉴定系统结果显示:SIM值为0.725,DIST值为4.029,PROB值为0.948,该系统鉴定菌株为食吡啉红球菌(*Rhodococcus pyridinivorans*)。

菌株的16S rRNA基因序列产物大小为1 345 bp,在NCBI网站上与GenBank中已知序列进行比对,通过邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树,其与戈登氏红球菌(*Rhodococcus gordoniae*)序列相似性达到99.9%,综合考虑,初步确定该菌株为*R. gordoniae*,并将其序列信息上传至NMDC数据库,登录号为NMDCN0000QJL。

#### 2.2 菌株 YKSW-6 的生长及降解特性

考察不同接种量时菌株YKSW-6的生长及降解特性。结果如图1所示,其中CK为不加菌时粪臭素随时间变化情况,30 h时粪臭素浓度为(98.8 $\pm$ 0.87) mg/L,其自然降解与微生物降解作用相比可忽略不计。当接种量为5%及以上时,菌株在适应期阶段粪臭素降解速率较

表 1 YKSW-6 菌株对 Biolog Gen III 微孔板碳源利用情况

Table 1 Utilization of carbon source in Biolog Gen III microplate by strain YKSW-6

| 碳源<br>Carbon source            | 培养时间<br>Time |      | 碳源<br>Carbon source               | 培养时间<br>Time |      | 碳源<br>Carbon source              | 培养时间<br>Time |      |
|--------------------------------|--------------|------|-----------------------------------|--------------|------|----------------------------------|--------------|------|
|                                | 24 h         | 48 h |                                   | 24 h         | 48 h |                                  | 24 h         | 48 h |
|                                |              |      |                                   |              |      |                                  |              |      |
| Negative control               | -            | -    | D-trehalose                       | \            | \    | Sucrose                          | +            | +    |
| D-raffinose                    | -            | -    | $\beta$ -methyl-D-glucoside       | -            | -    | N-acetyl- $\beta$ -D-mannosamine | -            | -    |
| $\alpha$ -D-glucose            | -            | +    | D-galactose                       | -            | -    | L-fucose                         | -            | -    |
| D-sorbitol                     | +            | +    | Myo-inositol                      | -            | -    | D-fructose-6-PO <sub>4</sub>     | \            | \    |
| Gelatin                        | -            | -    | L-arginine                        | -            | -    | L-histidine                      | \            | \    |
| Pectin                         | -            | -    | D-gluconic acid                   | \            | \    | Mucic acid                       | -            | -    |
| P-hydroxy-phenylacetic acid    | -            | -    | L-lactic acid                     | +            | +    | D-malic acid                     | \            | \    |
| Tween 40                       | +            | +    | $\beta$ -hydroxy-D,L-butyric acid | +            | +    | Propionic acid                   | +            | +    |
| Dextrin                        | \            | \    | D-cellobiose                      | -            | -    | D-turanose                       | \            | \    |
| $\alpha$ -D-lactose            | -            | -    | D-salicin                         | -            | -    | N-acetyl-D-galactosamine         | -            | -    |
| D-mannose                      | \            | \    | 3-methyl glucose                  | -            | -    | L-rhamnose                       | -            | -    |
| D-mannitol                     | +            | +    | Glycerol                          | -            | +    | D-aspartic acid                  | -            | -    |
| Glycyl-L-prolin                | -            | -    | L-aspartic acid                   | -            | -    | L-pyroglutamic acid              | -            | -    |
| D-galacturonic acid            | -            | -    | D-gluconic acid                   | -            | -    | Quinic acid                      | +            | +    |
| Methyl pyruvate                | -            | -    | Citric acid                       | \            | \    | L-malic acid                     | +            | +    |
| $\gamma$ -amino-butyric acid   | -            | -    | $\alpha$ -keto-butyric acid       | +            | +    | Acetic acid                      | +            | +    |
| D-maltose                      | -            | -    | Gentiobiose                       | -            | -    | Stachyose                        | -            | -    |
| D-melibiose                    | -            | -    | N-acetyl-D-glucosamine            | -            | -    | N-acetylneuraminic acid          | -            | -    |
| D-fructose                     | +            | +    | D-fucose                          | -            | -    | Inosine                          | -            | -    |
| D-arabitol                     | +            | +    | D-glucose-6-PO <sub>4</sub>       | -            | -    | D-serine                         | -            | -    |
| L-alanine                      | -            | -    | L-glutamic acid                   | -            | -    | L-serine                         | -            | -    |
| L-galactonic acid, g-lactone   | -            | -    | Glucuronamide                     | -            | -    | D-saccharic acid                 | -            | -    |
| D-lactic acid methyl ester     | \            | \    | $\alpha$ -keto-glutaric acid      | \            | \    | Bromo-succinic acid              | +            | +    |
| $\alpha$ -hydroxy-butyric acid | +            | +    | Acetoacetic acid                  | +            | +    | Formic acid                      | -            | -    |

注: +: 阳性; -: 阴性; \: 介于阴性和阳性之间

Note: +: Positive; -: Negative; \: Between of negative and positive.

表 2 YKSW-6 菌株对 Biolog Gen III 微孔板化学物质的抗性情况

Table 2 Resistance to chemicals in Biolog Gen III microplate by strain YKSW-6

| 化学物质<br>Chemicals | 培养时间<br>Time |      | 化学物质<br>Chemicals  | 培养时间<br>Time |      | 化学物质<br>Chemicals   | 培养时间<br>Time |      |
|-------------------|--------------|------|--------------------|--------------|------|---------------------|--------------|------|
|                   | 24 h         | 48 h |                    | 24 h         | 48 h |                     | 24 h         | 48 h |
|                   |              |      |                    |              |      |                     |              |      |
| Positive control  | +            | +    | pH 6.0             | +            | +    | pH 5.0              | -            | -    |
| 1% NaCl           | +            | +    | 4% NaCl            | +            | +    | 8% NaCl             | +            | +    |
| 1% sodium lactate | +            | +    | Fusidic acid       | -            | -    | D-serine            | +            | +    |
| Troleandomycin    | -            | -    | Rifamycin SV       | -            | -    | Minocycline         | -            | -    |
| Lincomycin        | -            | -    | Guanidine HCl      | +            | +    | Niaproof 4          | -            | -    |
| Vancomycin        | -            | -    | Tetrazolium violet | \            | \    | Tetrazolium blue    | -            | -    |
| Nalidixic acid    | +            | +    | Lithium chloride   | +            | +    | Potassium tellurite | +            | +    |
| Aztreonam         | +            | +    | Sodium butyrate    | +            | +    | Sodium bromate      | +            | +    |

注: +: 阳性; -: 阴性; \: 介于阴性和阳性之间

Note: +: Positive; -: Negative; \: Between of negative and positive.

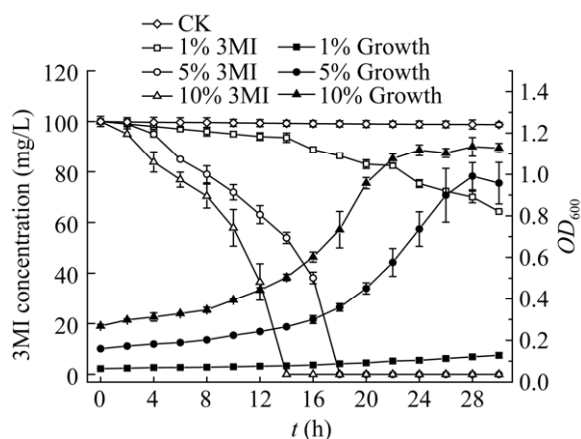


图1 菌株 YKSW-6 的生长-粪臭素降解曲线  
Figure 1 Growth and skatole-degrading curves of strain YKSW-6.

小, 当菌株生长到对数期时, 粪臭素降解速率增快, 说明在一定程度上粪臭素降解与菌株增长呈正相关。随着接种量的增加, 菌株生长的停滞期缩短, 粪臭素降解速率增加。当接种量为 1% 时, 菌株  $OD_{600}$  增加了 0.1, 生长缓慢, 同时粪臭素去除率为 20% 左右。当接种量为 5% 时, 停滞期为 8 h, 菌株在 18 h 左右完全降解 100 mg/L 粪臭素, 当培养至 28 h 时细菌数目达到峰值, 随后缓慢减少; 当接种量为 10% 时, 停滞期为 6 h, 菌株可在 14 h 内完全降解 100 mg/L 的粪臭素, 24 h 时进入平台期。综合考虑菌体的生长速度及培养液中细菌的含量, 在后续的实验中选择接种量为 5%、培养 28 h 作为时间节点取样和测定各项实验指标。

## 2.3 不同环境因素对菌株 YKSW-6 生长及降解粪臭素的影响

### 2.3.1 温度

由图 2A 可知, 在培养 28 h、温度超过 30 °C 时, 粪臭素去除率达到 100%。由图 2A 可知在 37 °C 时菌株 YKSW-6 长势最好。当温度在 25 °C 时粪臭素的去除率为 70% 左右, 表明该菌株在 25–42 °C 范围内都具有较高的降解粪臭素

的能力。

### 2.3.2 pH

pH 对微生物的生长至关重要, pH 改变会改变营养物质的供给状态, 影响菌体细胞膜的带电荷性质和稳定性, 对细胞膜通透性、胞内酶促反应影响很大, 还会影响菌体对物质的吸收能力。由图 2B 可知, 初始 pH 值为 6.0–9.0 时粪臭素去除率达到 100%, 并且菌株生长情况较好; 当 pH 值为 4.0–5.0 时, 去除率不足 40%, 同时菌株生长受到抑制, 说明菌株 YKSW-6 在中性及碱性环境时保持较好的活性且长势较好, pH < 6.0 的条件对菌株 YKSW-6 降解粪臭素的活性具有明显的抑制作用。

### 2.3.3 转速

转速与溶氧有关, 由图 2C 可知, 当转速在 180–240 r/min 时粪臭素被完全去除。转速通过影响氧气含量间接影响菌株生长及生物活性, 在转速为 0–180 r/min 时, 随着转速增加, 溶氧越高, 菌株生长越好, 粪臭素去除速度越快, 但菌株长势在转速增加到 240 r/min 时低于 180 r/min 时。

### 2.3.4 盐度

由图 2D 可知, 在培养基中 NaCl 浓度超过 3% 时生长受到影响, 粪臭素去除率不足 37%, 表明该菌株在 NaCl 浓度高时对粪臭素的降解效果减弱。

### 2.3.5 粪臭素

如图 3 所示, YKSW-6 菌株在无机盐培养基中的生长情况因粪臭素的浓度不同而异, 当粪臭素浓度为 50 mg/L 和 100 mg/L 时, 菌株生长较好, 同时粪臭素的去除率达到 100%; 当粪臭素浓度超过 150 mg/L 时其降解率低于 40%, 而且生长受到严重影响。

## 2.4 降解途径

对菌株 YKSW-6 降解粪臭素的产物进行 GC-MS 分析, 获得总离子流色谱图(TIC, 图 4),

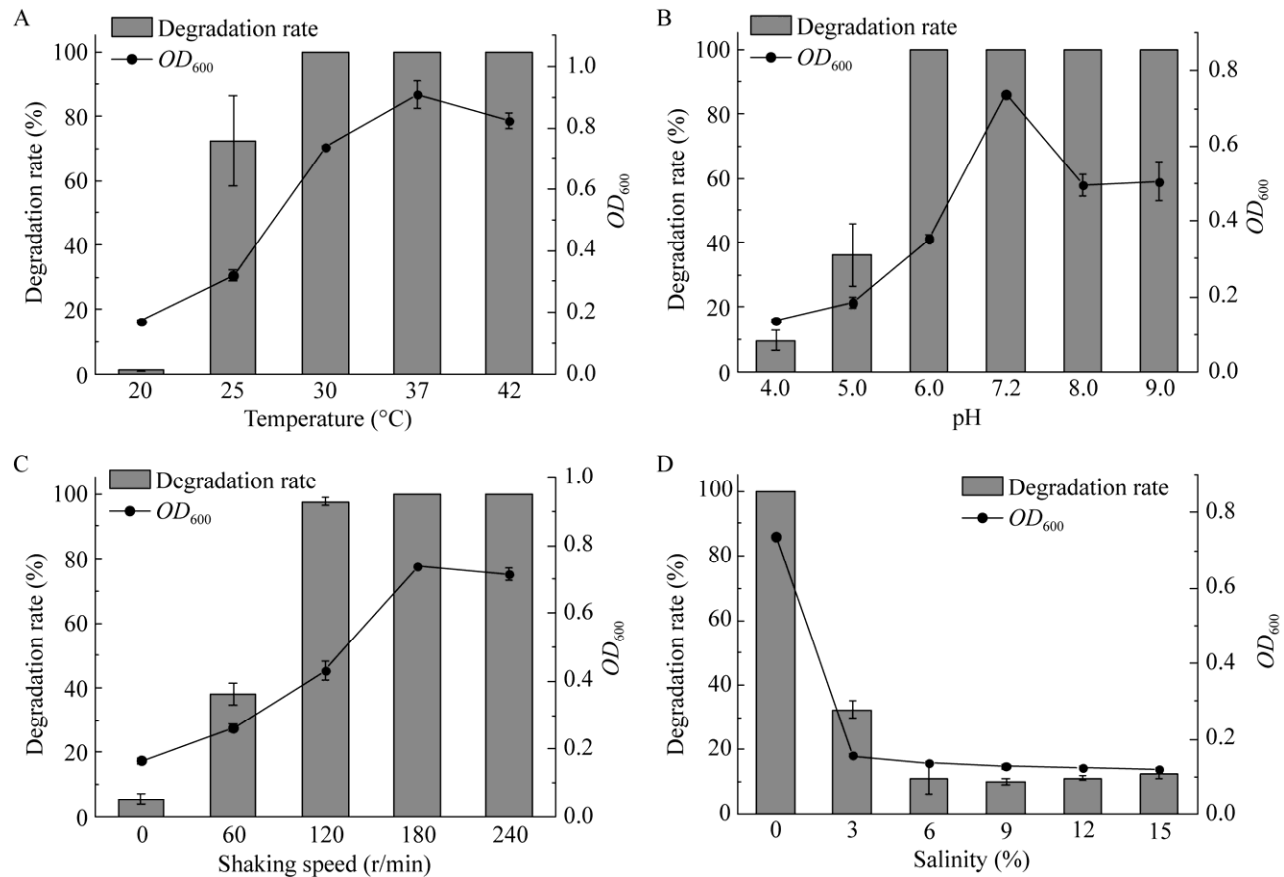


图 2 不同因素对菌株 YKSW-6 生长及降解粪臭素的影响 A: 温度; B: pH; C: 转速; D: NaCl  
Figure 2 Different factors on the growth and degradation of skatole by strain YKSW-6. A: Temperatures; B: pH; C: Rotate speed; D: NaCl.

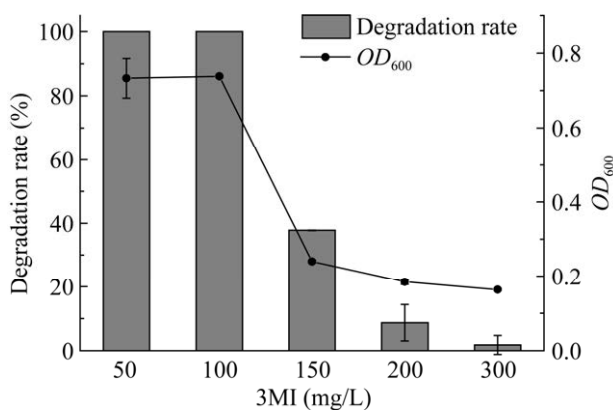


图 3 不同粪臭素浓度下 YKSW-6 菌株生长情况及其去除率

Figure 3 Growth and removal rate of YKSW-6 strain under different concentrations of skatole.

保留时间  $t=7.589$  min 时, 对应质谱离子峰  $m/z$  120.00, 经 NIST 2014 库检索归属为苯乙醛 (图 5A)。 $t=10.717$  min 时, 对应质谱离子峰  $m/z$  136.00, 经检索归属为苯乙酸 (图 5B)。 $t=13.981$  min 时, 对应质谱离子峰  $m/z$  147.00, 碎片离子峰 119.09、91.00、51.00, 可归属为 3-甲基吡啶-2-酮 (图 5C)。 $t=14.322$  min 时, 对应质谱离子峰  $m/z$  163.01, 经检索归属为 N-(2-乙酰基苯基)甲酰胺 (图 5D)。

根据本实验质谱结果, 推测菌株 YKSW-6 降解粪臭素的机理如图 6 所示。粪臭素在菌株的作用下 C2 先被氧化, 转变为 3-甲基羟基吡啶



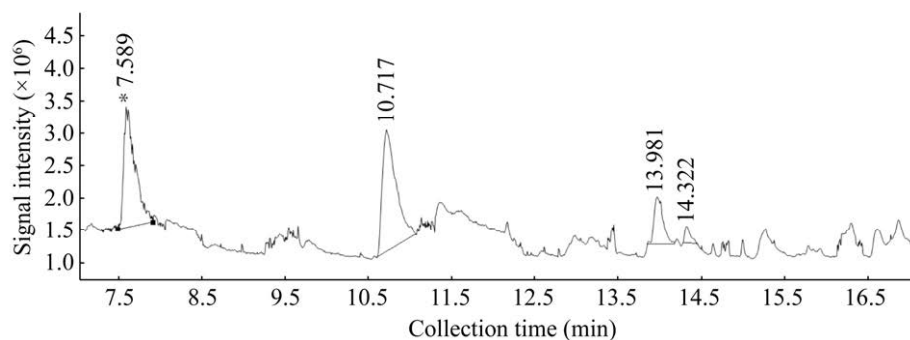


图 4 菌株 YKSW-6 降解粪臭素产物总离子流色谱图

Figure 4 Total ion chromatogram of skatole products degraded by strain YKSW-6.

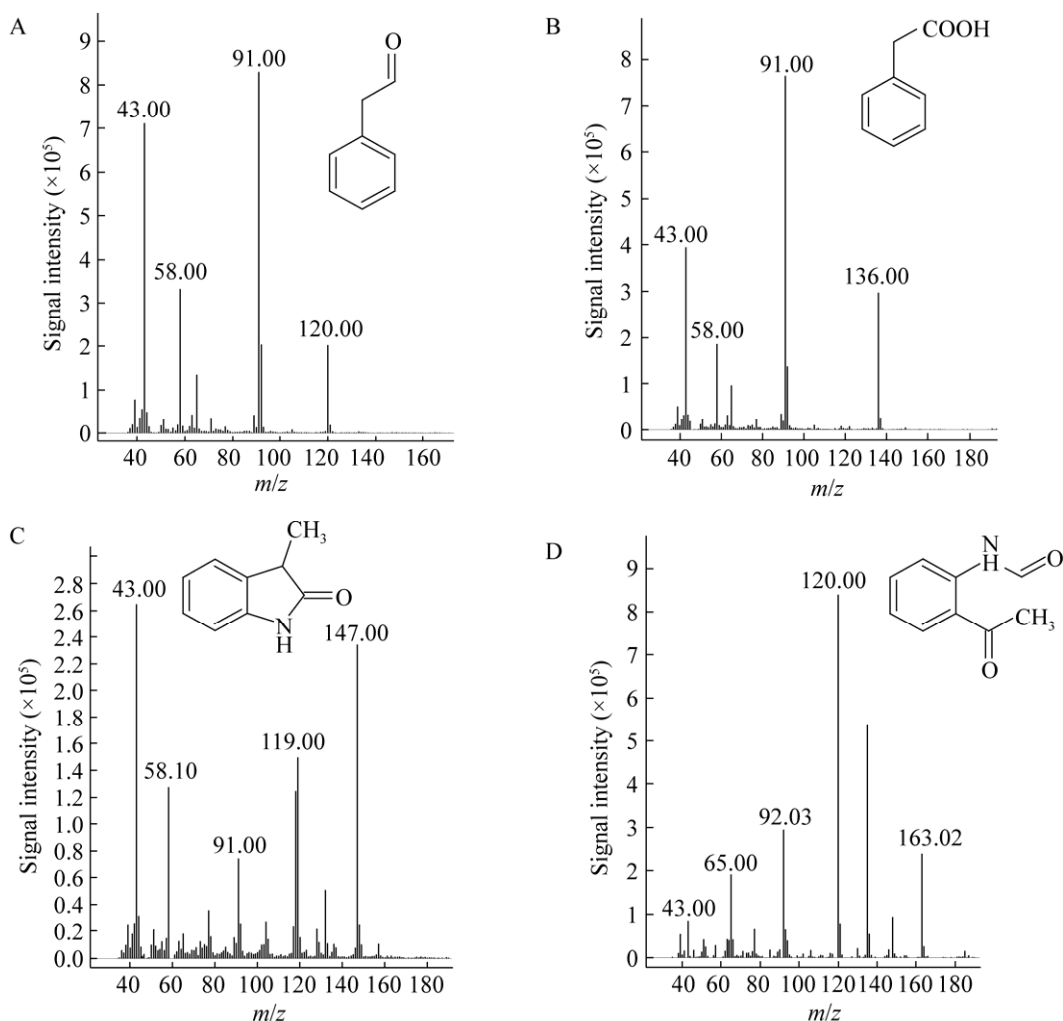


图 5 粪臭素代谢产物图谱 A: 苯乙醛; B: 苯乙酸; C: 3-甲基吲哚-2-酮; D: N-(2-乙酰基苯基)甲酰胺

Figure 5 Mass spectra of skatole metabolic intermediates. A: Phenylacetaldehyde; B: Phenylacetic acid; C: 3-methylindol-2-one; D: N-(2-acetylphenyl) formamide.

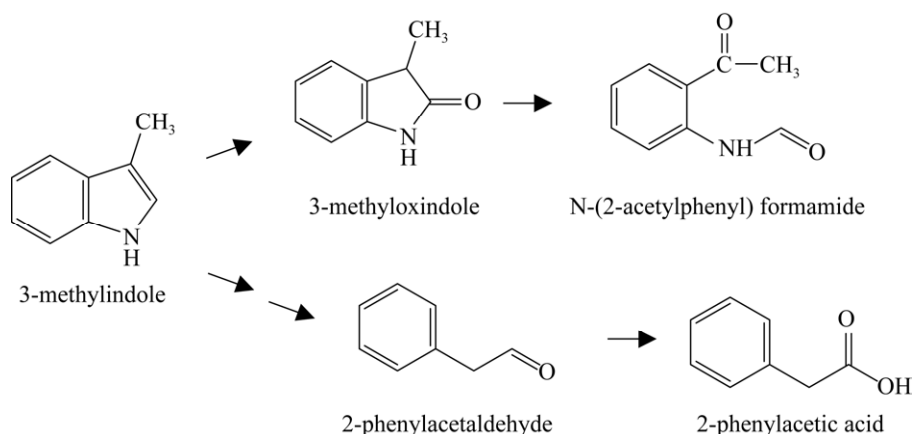


图 6 菌株 YKSW-6 降解粪臭素代谢途径推测

Figure 6 Proposed pathway of skatole degradation by strain YKSW-6.

(3-methyloxindole), 接着进一步被氧化为 N-(2-乙酰基苯基)甲酰胺[N-(2-acetylphenyl) formamide]。同时在降解液中还检测到了苯乙醛和苯乙酸, 由于粪臭素为唯一碳源, 因此推测粪臭素可能经过多步氧化、分解为苯乙醛, 再进一步氧化为苯乙酸, 以上中间代谢产物进入下游代谢途径三羧酸循环。

### 3 讨论

表 3 总结了已报道的粪臭素降解菌的降解特性。从表 3 可知, 厌氧或者氧限制条件下这类菌可降解高浓度的粪臭素(100–300 mg/L), 但是降解效率极低, 降解效果较好的好氧菌 *Burkholderia* sp. IDO3、*Rhodococcus* sp. DMU1 和 *Rhodococcus* sp. DMU2 需要培养 24 h 才能完全降解 50 mg/L 粪臭素。本研究从猪粪堆肥下土壤中分离到的红球菌 YKSW-6, 当接种量为 10% 时与 100 mg/L 粪臭素共培养 14 h 降解率高达 100%, 其降解能力远高于目前已经报道的 *Burkholderia* sp. IDO3 菌株, 是一株有潜力的粪臭素降解菌株。

前期研究表明, *R. gordoniae* 表现出初级分枝-杆状-球菌的生长周期, 具有分解苯酚<sup>[24]</sup>、

脱硫<sup>[25]</sup>作用。通过 SEM 观察, 该菌呈球状、短杆状两种不同形态, 表明该菌处于不同的生长阶段, 与前文研究一致, 本文报道的对粪臭素降解作用尚属首例。*Rhodococcus* 属含有大型基因组与环状质粒, 可分泌大量的活性酶, 能够有效降解石油烃<sup>[26]</sup>、有机腈<sup>[27]</sup>、霉菌毒素<sup>[28]</sup>等, 该属细菌在将来的环境生物修复中具有广阔的应用前景。YKSW-6 可利用多种碳源进行生长, 而且对多种化学敏感物具有抗性, 表明该菌具有较强的环境适应性。在 Ma 等<sup>[21]</sup>的研究中, *Rhodococcus* sp. DMU1 和 *Rhodococcus* sp. DMU2 在接种量为 1%、pH 7.0、温度 30 °C、转速 150 r/min 时可降解 50 mg/L 的粪臭素。在生长和粪臭素降解性能研究中, *Burkholderia* sp. IDO3 在 pH 4.0–9.0, 30–35 °C 时降解粪臭素性能最佳, 但未能完全降解粪臭素<sup>[20]</sup>。在本研究中, 当接种量为 5% 时菌株生长和降解粪臭素的最好条件为: pH 7.2, 温度 37 °C, 转速 180 r/min。该菌株在中高温(30–42 °C)和 pH 6.0–9.0 环境下降解率均能达到 100%, 在高温环境下仍有高效的降解效果, 是一株在含粪臭素污染的生物降解领域具有极大应用潜力的菌株。

表 3 粪臭素降解菌汇总

Table 3 Summary of skatole-degrading strains

| Strains   | Feature   | References |
|---|---|------------|
| <i>Clostridium malenominatum</i> A-3  | Under anaerobic conditions, 100 to 300 mg/L skatole could be degraded, and the degradation rate of 100 mg/L skatole reached 32.18% after 28 days of culture | [14]       |
| Marine anaerobic microorganisms   | Degraded skatole under sulfate-reducing condition   | [15]       |
| <i>Pseudomonas putida</i> LPC24   | Degraded 2.0 mmol/L (262.36 mg/L) skatole in 30 days under oxygen-limited conditions  | [16]       |
| <i>Lactobacillus brevis</i> 1.12  | The highest removal rate was 65% in 120 h (1.0 µg/mL skatole in 1 mL system)  | [17]       |
| <i>Rhodopseudomonas palustris</i> WKU-KDNS3                                     | Removed more than 90% skatole (13.12 mg/L) in 21 days   | [18]       |
| <i>Acinetobacter toweneri</i> NTA1-2A and <i>Acinetobacter gullouiae</i> TAT1-6 | Degraded >85% in 6 days when skatole concentration less than 200 mg/L   | [19]       |
| <i>Burkholderia</i> sp. IDO3  | Could remove 60 mg/L skatole within 16 h  | [20]       |
| <i>Rhodococcus</i> sp. DMU1 and DMU2  | Could remove 50 mg/L skatole within 24 h  | [21]       |
| <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> Rp3   | Could remove 50 mg/L skatole within 24 h  | [13]       |
| <i>Rhodococcus gordoniae</i> YKSW-6   | Could remove 100 mg/L skatole within 14 h   | This study |

截至目前, 粪臭素完整的降解途径尚不清楚, 粪臭素生物降解的功能基因仍然未知, 其中酶催化机制更需要去探究。当前的研究表明, 在动物细胞中粪臭素可被细胞色素 P450 酶代谢, 而细菌中未见报道<sup>[12]</sup>。已报道的粪臭素降解途径见图 7。在以往的研究中, Gu 等<sup>[15]</sup>报道了海洋厌氧微生物在硫酸盐还原条件下粪臭素的代谢途径, 粪臭素在 C2 处氧化, 在硫酸盐还原条件下, C1 和 C2 之间的吡咯环发生裂解, 转化为 2-(2-氨基苯基)丙酸[2-(2-aminophenyl) propanoic acid]。在溶氧限制条件下, 粪臭素在 C2 氧化后, 随后在 C2 和 C3 处进行羟基化和脱羟基化, 然后在 2 位和 3 位之间裂解吡咯环, 再在 2 位进行脱羧化<sup>[29]</sup>。Yin 等<sup>[30]</sup>报道了粪臭素在好氧条件下, 首先在 C3 位置被氧化生成吲哚啉-3-羧酸(indoline-3-carboxylic acid), 然后转化为吲哚啉-3-醇(indolin-3-ol), 粪臭素的吡咯环在 C2 位置和 C3 位置之间被裂解, 形成 2-甲酰基苯胺酸(2-formylanthranilic acid)。本研究中, 菌

株 YKSW-6 在以粪臭素为唯一碳源的情况下, 降解粪臭素的途径与参考文献[30]中 *Pseudomonas putida* LPC24 菌株在氧限制条件下相似, 而与已经报道的好氧途径不同, 其中的机理需进一步探究与验证。目前在粪臭素的好氧降解过程中已经发现的中间代谢物有 3-甲基-1H-吲哚-6-醇(3-methyl-1H-indol-6-ol)<sup>[31]</sup>、吲哚酚(indoxyl)<sup>[32]</sup>、2-氧代-3-甲基-3-羟基吲哚(2-oxo-3-methyl-3-hydroxyindole)<sup>[11]</sup>。本研究首次发现在粪臭素降解过程中形成了苯乙醛和苯乙酸。

## 4 结论

(1) 筛选获得能以粪臭素为唯一碳源和能源的高效粪臭素降解菌 *R. gordoniae* YKSW-6。菌株 YKSW-6 能够利用 D-山梨醇、溴-丁二酸等 18 种碳源, 对亚碲酸钾、溴酸钾等 13 种化学敏感物具有抗性。粪臭素的去除率与初始接种量有关, 接种量越大则去除速率越高。接种量为 5% 时, 菌株 YKSW-6 与 100 mg/L 粪臭素

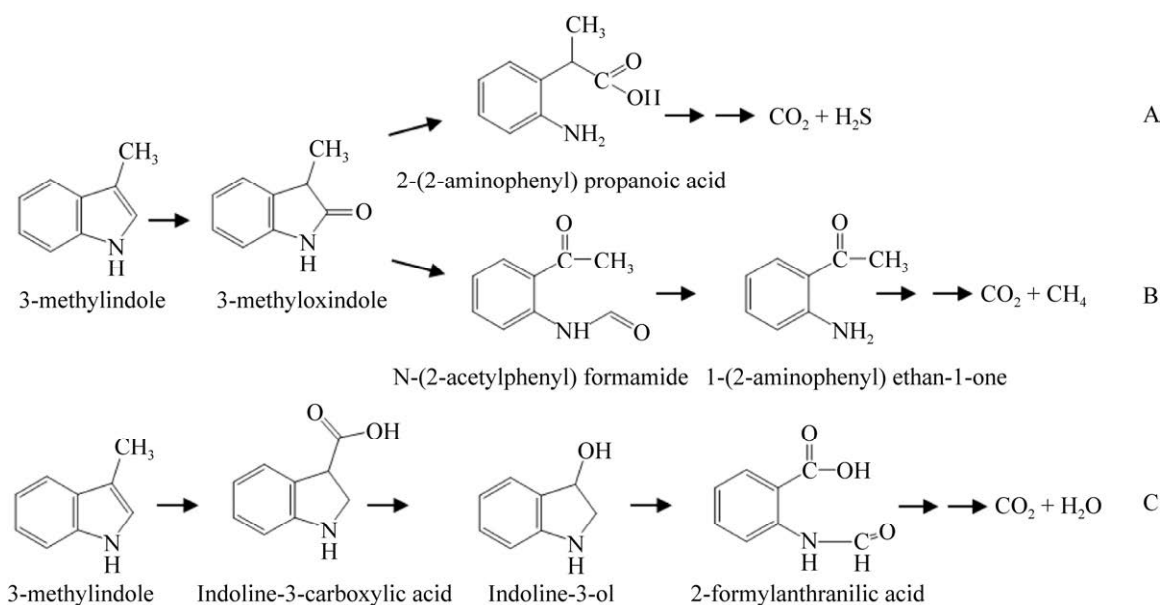


图 7 不同条件下粪臭素降解途径 A: 硫酸盐还原条件<sup>[15]</sup>; B: 氧限制条件<sup>[29]</sup>; C: 好氧条件<sup>[30]</sup>

Figure 7 Proposed pathways of skatole degradation under different conditions. A: Sulfate-reducing conditions<sup>[15]</sup>; B: Oxygen-limited conditions<sup>[29]</sup>; C: Aerobic conditions<sup>[30]</sup>.

共培养 18 h 的去除率达 100%; 接种量为 10% 时共培养 14 h 其去除率达到 100%。

(2) 接种量为 5% 时, 菌株生长和降解粪臭素的最佳条件为: pH 7.2, 温度 37 °C, 转速 180 r/min。该菌株在中高温(30–42 °C)和 pH 6.0–9.0 环境下降解率均能达到 100%, 是一株在含粪臭素污染的生物降解领域具有应用潜力的菌株。

(3) 利用 GC/MS 对菌株代谢粪臭素的产物进行分析。结果显示: 粪臭素在菌株的作用下 C2 先被氧化, 转变为 3-甲基羟基吲哚(3-methyloxindole), 接着进一步被氧化为 N-(2-乙酰苯基)甲酰胺[N-(2-acetylphenyl) formamide]。同时中间产物还有苯乙醛和苯乙酸。

## REFERENCES

- [1] Thorne PS. Industrial Livestock Production Facilities: Airborne Emissions[A]//Encyclopedia of Environmental Health[M]. Amsterdam: Elsevier, 2019: 652-660
- [2] Lebrero R, Bouchy L, Stuetz R, Muñoz R. Odor assessment and management in wastewater treatment plants: a review[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2011, 41(10): 915-950
- [3] Yokoyama MT, Carlson JR. Microbial metabolites of tryptophan in the intestinal tract with special reference to skatole[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1979, 32(1): 173-178
- [4] Dunlop MW, Blackall PJ, Stuetz RM. Odour emissions from poultry litter-a review litter properties, odour formation and odourant emissions from porous materials[J]. Journal of Environmental Management, 2016, 177: 306-319
- [5] Liu DZ, Wei YF, Liu XY, Zhou Y, Jiang L, Yin JY, Wang FF, Hu YL, Nanjaraj Urs AN, Liu YH, et al. Indoleacetate decarboxylase is a glycyl radical enzyme catalysing the formation of malodorant skatole[J]. Nature Communications, 2018, 9: 4224
- [6] 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
- [7] Weems JM, Cutler NS, Moore C, Nichols WK, Martin D, Makin E, Lamb JG, Yost GS. 3-methylindole is

- mutagenic and a possible pulmonary carcinogen[J]. *Toxicological Sciences*, 2009, 112(1): 59-67
- [8] Nichols WK, Mehta R, Skordos K, Macé K, Pfeifer AMA, Carr BA, Minko T, Burchiel SW, Yost GS. 3-methylindole-induced toxicity to human bronchial epithelial cell lines[J]. *Toxicological Sciences*, 2003, 71(2): 229-236
- [9] Millar JG, Chaney JD, Mulla MS. Identification of oviposition attractants for *Culex quinquefasciatus* from fermented Bermuda grass infusions[J]. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1992, 8(1): 11-17
- [10] Guffanti P, Pifferi V, Falciola L, Ferrante V. Analyses of odours from concentrated animal feeding operations: a review[J]. *Atmospheric Environment*, 2018, 175: 100-108.
- [11] Fujioka M, Wada H. The bacterial oxidation of indole[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA-General Subjects*, 1968, 158(1): 70-78
- [12] Ma Q, Meng N, Li YJ, Wang JW. Occurrence, impacts, and microbial transformation of 3-methylindole (skatole): a critical review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 416: 126181
- [13] 吴玉洪, 张世昌, 田茜, 马桂珍, 郭荣君, 李世东, 钟增明. 堆肥臭味物质: 粪臭素高效降解菌 Rp3 的分离和鉴定[J]. *农业资源与环境学报*, 2021, 38(4): 576-584
- Wu YH, Zhang SC, Tian Q, Ma GZ, Guo RJ, Li SD, Zhong ZM. Isolation and identification of a high-efficiency bacterial strain Rp3 to degrade skatole: an odor chemical in compost[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2021, 38(4): 576-584 (in Chinese)
- [14] Kohda C, Ando T, Nakai Y. Isolation and characterization of anaerobic indole- and skatole-degrading bacteria from composting animal wastes[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 1997, 43(5): 249-255
- [15] Gu JD, Fan YZ, Shi HC. Relationship between structures of substituted indolic compounds and their degradation by marine anaerobic microorganisms[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45(1/12): 379-384
- [16] Li P, Tong L, Liu K, Wang Y. Biodegradation of 3-methylindole by *Pseudomonas putida* LPC24 under oxygen limited conditions[J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2010, 19(2): 238-242
- [17] Meng X, He ZF, Li HJ, Zhao X. Removal of 3-methylindole by lactic acid bacteria *in vitro*[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2013, 6(4): 983-988
- [18] Sharma N, Doerner KC, Alok PC, Choudhary M. Skatole remediation potential of *Rhodopseudomonas palustris* WKU-KDNS<sub>3</sub> isolated from an animal waste lagoon[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 60(3): 298-306
- [19] Tesso TA, Zheng AJ, Cai HY, Liu GH. Isolation and characterization of two *Acinetobacter* species able to degrade 3-methylindole[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0211275
- [20] Ma Q, Qu H, Meng N, Li SZ, Wang JW, Liu SW, Qu YY, Sun YQ. Biodegradation of skatole by *Burkholderia* sp. IDO3 and its successful bioaugmentation in activated sludge systems[J]. *Environmental Research*, 2020, 182: 109123
- [21] Ma Q, Liu SW, Li SZ, Hu JB, Tang MY, Sun YQ. Removal of malodorant skatole by two enriched microbial consortia: performance, dynamic, function prediction and bacteria isolation[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 725: 138416
- [22] 杨冰玉, 林宇星, 戴春晓, 闫永全, 朴世元, 刘莘轶, 曲媛媛. *Alcaligenes* sp. YBY 降解吡啶的特性研究[J]. *环境科学与技术*, 2018, 41(12): 1-6
- Yang BY, Lin YX, Dai CX, Yan YQ, Piao SY, Liu ZY, Qu YY. Characterization of an indole-degrading bacterium *Alcaligenes* sp. YBY[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 41(12): 1-6 (in Chinese)
- [23] 张岚, 张兆昌, 张玉秀, 张俊亚, 魏源送, 姜超, 赵钢, 杨金. 活性污泥中耐盐菌的筛选及其对有机物的去除研究[J]. *中国给水排水*, 2016, 32(23): 88-91
- Zhang L, Zhang ZC, Zhang YX, Zhang JY, Wei YS, Jiang C, Zhao G, Yang J. Screening of salt-tolerant bacteria in activated sludge and removal of organic matter[J]. *China Water & Wastewater*, 2016, 32(23): 88-91 (in Chinese)
- [24] Jones AL, Brown JM, Mishra V, Perry JD, Steigerwalt AG, Goodfellow M. *Rhodococcus gordoniae* sp. nov., an actinomycete isolated from clinical material and phenol-contaminated soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(2): 407-411
- [25] Sricoth T, Pokethitiyook P, Poolpak T, Kruatrachue M.

- Desulfurization of oil by recombinant *Rhodococcus gordoniae* strain R3[A]//Environmental Science and Sustainable Development[C]. Bangkok, Thailand. WORLD SCIENTIFIC, 2016: 415-425
- [26] Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri A. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(2/3): 143-152
- [27] Baxter J, Garton NJ, Cummings SP. The impact of acrylonitrile and bioaugmentation on the biodegradation activity and bacterial community structure of a topsoil[J]. Folia Microbiologica, 2006, 51(6): 591-597
- [28] Cserhádi M, Kriszt B, Krifaton C, Szoboszlay S, Háhn J, Tóth S, Nagy I, Kukolya J. Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(1): 176-185
- [29] Li P, Wang YH, Jiang Z, Tong L. Bioaugmentation of cellulose degradation in swine wastewater treatment with a composite microbial consortium[J]. Fresenius Environmental Bulletin, 2010, 19(12): 3107-3112
- [30] Yin B, Gu JD. Aerobic degradation of 3-methylindole by *Pseudomonas aeruginosa* gs isolated from mangrove sediment[J]. Human and Ecological Risk Assessment: an International Journal, 2006, 12(2): 248-258
- [31] 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
- [32] Proctor MH. Bacterial dissimilation of indoleacetic acid: a new route of breakdown of the indole nucleus[J]. Nature, 1958, 181(4619): 1345