

一株对乙氧基苯胺降解菌的筛选及降解特性

邱顺达¹, 周正蓉¹, 杨宇航¹, 刘双元², 闫达中¹, 邱东茹³, 晁红军¹,
戴景程^{1*}

1 武汉轻工大学 生命科学与技术学院, 湖北 武汉

2 生态环境部珠江流域南海海域生态环境监督管理局, 生态环境监测与科学研究中心, 广东 广州

3 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉

邱顺达, 周正蓉, 杨宇航, 刘双元, 闫达中, 邱东茹, 晁红军, 戴景程. 一株对乙氧基苯胺降解菌的筛选及降解特性[J]. 微生物学报, 2026, 66(4): 1726-1746.

QIU Shunda, ZHOU Zhengrong, YANG Yuhang, LIU Shuangyuan, YAN Dazhong, QIU Dongru, CHAO Hongjun, DAI Jingcheng. Screening and degradation characterization of a *para*-ethoxyaniline-degrading strain[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(4): 1726-1746.

摘要: 对乙氧基苯胺(*para*-ethoxyaniline, ETH)作为一种广泛应用的工业原料和中间体, 其在环境中的残留可能具有持久性, 从而对生态环境和人类健康构成潜在风险。【目的】从活性污泥中筛选对 ETH 具有高效降解能力的菌株, 优化其降解条件, 并基于转录组学和质谱分析揭示该菌株在 ETH 胁迫下的基因表达调控机制, 识别关键降解相关基因及代谢通路。【方法】以 ETH 为唯一碳源, 从活性污泥中筛选和分离高效降解菌株, 结合形态学观察、生理生化实验, 以及基于 16S rRNA 基因序列构建系统发育树分析, 对目标菌株进行分类鉴定。研究不同温度、pH 和 ETH 初始浓度对菌株生长及 ETH 降解效率的影响。进一步利用转录组测序技术鉴定相关差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 并使用实时荧光定量逆转录 PCR (real-time reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR)验证部分上调基因, 结合质谱分析结果深入解析相关代谢通路。【结果】成功分离获得 1 株 ETH 高效降解菌 DQ78, 经形态学观察及分子生物学鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)。降解条件优化试验结果表明, 菌株 DQ78 在温度 28 °C、pH 8.0、ETH 初始浓度 4 mmol/L、接种量 1% 的条件下, 40 h 内对 ETH 的降解率达到 100%。对其降解产物进行鉴定, 共鉴定出 3 种中间产物, 初步提出了 ETH 的降解途径。转录组分析显示, ETH 诱导组检测到 3 380 个 DEGs, 其中 1 609 个基因上调, 1 771 个基因下调。GO 富集分析表明, 在 ETH 胁迫条件下上调基因显著富集的 GO terms 有 57 个, 主要涉及氨基酸代谢和合成、细胞运动、三价铁结合、物质转运等过程, 这些通路可激活 ETH 降解相关酶的合成, 增强底物摄取及中间产物

资助项目: 国家自然科学基金(32102769); 湖北省自然科学基金(2022CFB403)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32102769) and the Natural Science Foundation of Hubei Province (2022CFB403).

*Corresponding author. E-mail: daijingcheng@whpu.edu.cn

Received: 2025-11-20; Accepted: 2025-12-31; Published online: 2026-01-14

跨膜代谢。下调的 GO terms 有 58 个, 主要包括肽的代谢与合成、核糖体结构及细胞组成等通路, 反映菌株为优先保障 ETH 降解相关功能蛋白合成, 对非核心代谢进行能量重分配。KEGG 富集结果显示, 在 ETH 胁迫条件下上调的通路有 183 个, 下调的有 184 个, 主要涉及鞭毛组装、硫代谢及胞外生物合成等, 表明菌株通过增强底物趋化捕获, 促进酶分泌与抗逆物质合成等方式协同响应 ETH 胁迫。【结论】菌株 DQ78 在 40 h 内完全降解 ETH, 为环境中 ETH 污染的生物修复提供了优良菌种和理论支持。转录组分析揭示了该菌响应 ETH 的分子调控机制, 为深入探索微生物降解有机污染物的遗传基础提供了理论支持。

关键词: 对乙氧基苯胺; 假单胞菌; 转录组测序; 差异表达基因

Screening and degradation characterization of a *para*-ethoxyaniline-degrading strain

QIU Shunda¹, ZHOU Zhengrong¹, YANG Yuhang¹, LIU Shuangyuan², YAN Dazhong¹, QIU Dongru³, CHAO Hongjun¹, DAI Jingcheng^{1*}

1 School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei, China

2 Eco-Environmental Monitoring and Research Center, Pearl River Valley and South China Sea Ecology and Environment Administration, Ministry of Ecology and Environment, Guangzhou, Guangdong, China

3 Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei, China

Abstract: *Para*-ethoxyaniline (ETH), a widely used industrial raw material and intermediate, persists in the environment, posing potential risks to ecosystems and human health. **[Objective]** To isolate an efficient ETH-degrading strain from activated sludge, optimize its degradation conditions, and elucidate the gene regulatory mechanisms and metabolic pathways under ETH stress by transcriptomic and mass spectrometric analyses. **[Methods]** A strain capable of utilizing ETH as the sole carbon source was isolated from activated sludge and identified through morphological observation, physiological and biochemical tests, and phylogenetic tree construction based on 16S rRNA gene sequences. The effects of temperature, pH, and initial ETH concentration on bacterial growth and degradation efficiency were examined. Transcriptome sequencing was employed to identify differentially expressed genes (DEGs), with selected up-regulated DEGs validated by real-time reverse transcription quantitative (RT-qPCR). Furthermore, mass spectrometry was employed to investigate the metabolic pathways. **[Results]** A highly efficient ETH-degrading strain, designated DQ78 and identified as *Pseudomonas* sp., was isolated. Under optimal conditions (28 °C, pH 8.0, 4 mmol/L ETH, and 1% inoculum), it completely degraded ETH within 40 h. Three metabolic intermediates were identified, allowing the proposal of a preliminary degradation pathway. Transcriptomic analysis revealed 3 380 DEGs under ETH stress, including 1 609 up-regulated and 1 771 down-regulated genes. GO enrichment indicated up-regulated genes were primarily involved in 57 GO terms such as amino acid metabolism, cell motility, iron binding, and transport, which might activate the synthesis of ETH-degrading enzymes and enhance substrate

uptake and transmembrane metabolism of intermediates. The down-regulated genes were enriched in 58 GO terms such as peptide metabolism and synthesis, ribosomal structure, and cellular components, suggesting a metabolic reallocation toward stress adaptation. KEGG analysis predicted 183 up-regulated pathways and 184 down-regulated pathways such as flagellar assembly, sulfur metabolism, and extracellular biosynthesis under ETH stress, indicating enhanced chemotaxis, enzyme secretion, and stress-resistant substance synthesis. **[Conclusion]** Strain DQ78 achieved complete degradation of ETH within 40 h, being a promising candidate for the bioremediation of ETH-contaminated environments. Transcriptomic analysis reveals the molecular regulatory mechanism of this strain in response to ETH, which lays a theoretical foundation for further exploring the genetic foundation of microbial degradation of organic pollutants.

Keywords: *para*-ethoxyaniline; *Pseudomonas*; transcriptome sequencing; differentially expressed genes

芳香胺(aromatic amines, AAs)是一类具有广泛工业应用的工业化学品, 作为合成染料、药物和农药的关键中间体, 其在环境中表现出持久性特征^[1]。然而, 大量研究证实多数 AAs 具有诱变与致癌潜力, 对生态系统和人类健康构成显著威胁^[2-3]。快速工业化和化学合成技术的进步加剧了 AAs 在环境中的积累, 这已成为亟待解决的污染问题^[4]。值得关注的是, 对乙氧基苯胺(*para*-ethoxyaniline, ETH)作为典型的 AAs 衍生物广泛应用于食品、化工、制药等工业领域。其苯环上的乙氧基取代基赋予分子更高的化学稳定性与生物毒性。Pauluhn 等^[5]发现 ETH 可导致哺乳动物贫血、肝肾损伤等不良反应, 凸显了其环境风险的严峻性。

目前, 芳香胺等有毒难降解工业废水的处理方法有液膜萃取法、吸附法、光催化、超临界氧化、Fenton 氧化等^[6]。Zeng 等^[7]发现苯甲醚改性超交联树脂可高效吸附水溶液中的苯胺, 但吸附剂生物毒性大、污染较重。夏爽^[8]发现利用超临界水氧化法可高效去除工业废水中的苯胺焦油, 去除率达到 99.99%, 但所需温度和压力较高(温度>374 °C, 压力>22.1 MPa), 对设备的要求也很高。相比之下, 微生物降解技术因其环境友好, 被视为更具前景的治理途径。已有报道显示, 芽孢杆菌属^[9]、曲霉菌属^[10]和假

单胞菌属^[11]等多个微生物类群具备降解 AAs 的能力。其中, 假单胞菌属因其卓越的代谢适应性, 能够以 AAs 为唯一碳源进行生长与转化, 展现出特殊的应用潜力^[12]。

近年来, 多组学高通量测序技术的突破为解析微生物应答环境胁迫的分子机制提供了全新视角^[13]。目前, 尽管已有研究从基因层面对芳香胺降解菌的代谢基因簇进行了探索, 但基于转录组学系统揭示其降解机制与抗胁迫调控的研究仍较为匮乏^[14]。转录组测序能够直接反映特定生理状态下细胞的基因表达差异, 不仅可系统识别差异表达基因, 更能从转录动态层面阐释污染物降解途径的关键环节^[15]。此外, 转录组学研究还可通过差异基因表达分析, 系统地解析微生物在环境胁迫下应激反应的分子机制^[16]。Wang 等^[17]发现在磺胺甲恶唑胁迫条件下, 魔鬼弧菌(*Vibrio diabolicus*) L2-2 中有 328 个与磺胺甲恶唑解毒相关的差异表达基因, 其中膜转运和抗氧化相关基因显著上调, 揭示了其解毒机制。Zhang 等^[18]对降解磺胺嘧啶的黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)的转录组分析发现 5 097 个上调基因, 其中代谢通路的全局激活在抗生素降解中发挥重要作用。这些研究表明, 转录组学在揭示微生物环境适应性机制方面具有重要作用。

本研究报道了一株具有高效 ETH 降解效率的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) DQ78, 通过比较其在琥珀酸(对照组)与 ETH 为唯一碳源(诱导组)条件下的基因表达差异, 寻找表型与基因型之间的相互关系, 系统解析菌株在 ETH 胁迫下的基因表达响应与代谢通路重构。本研究旨在从转录层面揭示 ETH 的生物降解路径与菌株的抗逆机制, 为进一步阐明其生理生化与遗传基础提供理论依据, 同时也为开发针对乙氧基苯胺污染的高效生物修复策略提供菌种资源与科学支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

从武汉市东西湖区污水处理厂的活性污泥中分离纯化出假单胞菌 DQ78。菌株保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 M20232365。

1.1.2 主要试剂和仪器

对乙氧基苯胺, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 甲醇, 赛默飞世尔科技公司; 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司。

生化培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 高压自动灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 恒温摇床, 上海新苗医疗器械制造有限公司; 高效液相色谱, 依利特(大连)分析仪器有限公司; PCR 仪, 耶拿分析仪器(北京)有限公司。

1.1.3 培养基

基本培养基(minimal medium, MM)(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.3, KH_2PO_4 3.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.000 3, 500×贮存液 2.0 mL; 500×贮存液(g/L): $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.14, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, CuSO_4 0.025, ZnSO_4 0.025, H_3BO_3 0.025。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 5.0。

所有培养基 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 降解 ETH 菌株的富集和分离

采集武汉市东西湖区污水处理厂活性污泥样本, 取 1.0 g 活性污泥加入 100 mL 含 ETH (2 mmol/L) 的 MM 培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 7 d。取 5% 培养基的上清液接种于 100 mL 含有 2 mmol/L ETH 的液体 MM 培养基中, 28 °C、200 r/min 继续培养 7 d。该过程连续传代 8 次后, 获得含有降解 ETH 菌株的混合培养物。

1.3 降解 ETH 菌株的纯化

将初筛获得的 ETH 降解菌菌液, 通过划线分离法接种至含 2 mmol/L ETH 的固体 MM 培养基, 28 °C 倒置培养。培养 7 d 后, 根据菌株边缘形态、菌落颜色及隆起度等特征差异, 挑取不同单克隆分别接种至含 2 mmol/L ETH 的液体 MM 培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 24 h。连续进行 2 次划线分离与单菌落挑取操作。将纯化后的单菌落接种到 5 mL 液体 MM 培养基中, ETH 终浓度为 2 mmol/L, 28 °C、200 r/min 培养 48 h, 以不接菌的培养基作为空白对照, 每株菌进行 3 次重复试验。

采用高效液相色谱(HPLC)法测定 ETH 含量, 色谱柱选用 Accucore C18 柱(长度 250 mm×内径 4.6 mm×粒径 2.6 μm), 流动相由等体积的甲醇与纯水组成(A 相: 50% 甲醇; B 相: 50% 纯水), 流速控制为 0.5 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温 30 °C, 采用紫外检测器在 290 nm 波长下检测。按照公式(1)计算菌株对 ETH 的降解率。

$$\text{ETH降解率} = \frac{(\text{空白对照组浓度} - \text{试验组浓度})}{\text{对照组浓度}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4 菌株形态及理化特性检测

取筛选获得的目标菌株, 采用平板划线接种法接种至 LB 固体培养基表面, 28 °C 培养 48 h, 观察其菌落形态, 挑取形态均一、无杂菌污染的单菌落进行电镜观察。选取目标菌株 DQ78, 参照 Biolog GENIII 鉴定板说明书将处于对数生长期的菌株制备为适宜浓度的菌悬液, 以 100 μL/孔的量加入 Biolog GENIII 96 孔鉴定板, 该板包含

阳性对照、阴性对照以及 71 种碳源和 23 种化学敏感物质。接种后于 28 °C 避光培养 48 h, 根据颜色反应判断菌株碳源利用情况。

1.5 16S rRNA 基因核苷酸序列检测

取菌株新鲜菌液作为扩增模板, 用 16S rRNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACG ACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times Taq Mix 10 μ L, 去离子水 7 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 5 min; 16 °C 保温 10 min 终止反应。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测(上样量 5 μ L), 合格样品送生工生物工程(上海)股份有限公司进行 16S rRNA 基因测序, 测序得到的 16S rRNA 基因序列已上传至 NCBI GenBank 数据库, 登录号为 PX462094; 通过 BLAST 比对该序列与 GenBank 中已知序列的同源性, 选取 14 株序列相似度较高的菌株作为参考序列, 并利用 MEGA 11.0 软件, 用邻接(neighbor-joining)法进行分子系统学分析。

1.6 不同条件对菌株生长的影响

参照文献[19]方法, 将经 LB 液体培养基 28 °C、200 r/min 复苏 12 h 的 DQ78 菌株, 按体积分数为 1% 的接种量接种至对应培养基, 通过紫外分光光度计测定 OD_{600} 值分析生长情况, 各处理均设 3 次重复。

将上述复苏后的 DQ78 菌株按体积分数为 1% 的接种量接种于 100 mL 灭菌的 LB 培养基, 28 °C、200 r/min 培养 45 h, 分别在 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45 h 取样测 OD_{600} 值并绘制生长曲线。将复苏后 DQ78 菌株按 1% 的接种量接种于 5 mL 灭菌的 LB 培养基, 28 °C、200 r/min 培养 45 h 后测 OD_{600} 值并绘图。设置温度梯度为 19、24、28、32、37 °C; 初始 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0; 初始 ETH 浓度为

1–6 mmol/L, 分别确定最适生长条件。

1.7 不同条件对菌株降解 ETH 的影响

参照文献[19]方法, 将经 LB 培养基在 28 °C、200 r/min 培养复苏至对数生长期(OD_{600} 约为 0.4)的 DQ78 菌液, 经 8 000 r/min 离心 10 min, 无菌去离子水洗涤 2 次后重悬, 按 1% 的接种量接入 30 mL MM 培养基(含 ETH)。试验设 3 次生物学重复, 以不接种菌液为空白对照, 培养 45 h 后进行检测。取 500 μ L 菌液, 加入等体积甲醇终止反应, 经 0.22 μ m 有机相滤膜过滤后, 采用 HPLC 法测定 ETH 残留量, 以峰面积法定量并计算降解率。

单因素变量降解时间分别设置为 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45 h 取样; 降解温度分别设置为 19、24、28、32、37 °C; 初始 pH 设置为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0; ETH 初始浓度设置为 1、2、3、4、5、6 mmol/L, 分别确定最适降解条件。

1.8 ETH 生物降解产物的鉴定

将菌株 DQ78 培养至对数生长期 OD_{600} 约为 0.4, 经 8 000 r/min 离心 10 min 后收集菌体沉淀, 将所得菌体沉淀用等体积培养基重悬, 按 1% 的接种量转接至 MM 培养基中, 该培养基初始 ETH 浓度为 4 mmol/L、pH 值调至 8.0, 在 28 °C、200 r/min 摇床培养。设 3 组平行及无菌空白对照。分别于 12、24、48 h 取样。每次取样 0.5 mL 并加入 0.5 mL 甲醇混匀, 经 0.22 μ m 有机滤膜过滤后避光保存。

采用超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS)分析产物的分子质量。将 2 μ L 样品经 Venusil MP C18 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m)分离。流动相由 A 和 B 组成, 其中流动相 A 为水溶液, 流动相 B 为甲醇溶液。设定流速为 0.2 mL/min, 柱温维持在 30 °C; 经色谱柱分离后的样品导入质谱仪进行检测。采用正、负离子扫描模式采集样品质谱信号, 质量扫描范围为 100–200 m/z 。正模式离子喷雾电压为 1 000 V, 负模式离子喷

雾电压为-1 000 V。

1.9 菌株 DQ78 的转录组测序

1.9.1 样品处理

挑取菌株 DQ78 单菌落, 接种至 100 mL 的 LB 液体培养基, 28 °C、200 r/min 培养至对数生长期(OD_{600} 约为 0.4), 于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀。对照组和试验组分别以 4 mmol/L 的琥珀酸和 ETH 作为唯一碳源, 28 °C、200 r/min 孵育 1 h 后, 分别于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集沉积物。将琥珀酸孵育的样本命名为 CK, 将 ETH 孵育的样本命名为 ETH, 然后在-80 °C 保存。所有试验均进行 3 个生物重复。

1.9.2 测序数据处理

样本经低温保存后送往上海美吉生物医药科技有限公司进行 RNA 提取和 cDNA 文库制备。采用 Illumina 高通量测序平台 NovaSeq X Plus 进行 RNA-seq 转录组测序。对原始测序读段(reads)进行质量修剪, 切除末端测序质量值小于 Q20 的碱基序列, 经此步骤筛选得到的高质量测序数据, 定义为 clean data。使用 RSeQC-2.3.6 软件将 clean data 与参考基因组进行比对, 获得 mapped data, 进行后续基因表达量统计和差异分析。所有测序原始数据均已通过 NCBI SRA 数据库公开, SRA 登录号为 PRJNA1347660, 数据可经该登录号免费获取, 确保研究结果可重复验证。

1.9.3 差异基因表达及富集分析

基于 CK、ETH 与参考基因组比对结果, 采用每百万转录本数(transcripts per million, TPM)用于定量转录本的表达水平^[20]。采用基于负二项分布模型的 DESeq2 软件对原始读段计数(raw count)进行统计分析, 以 read count 平均值计算差异倍数(fold change, FC), 将 $|\log_2 FC| > 1$ 且校正后显著性水平 $P_{adj} \leq 0.05$ 的基因定义为显著差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),

其中 $\log_2 FC > 1$ 定义为显著上调基因, $\log_2 FC < -1$ 定义为显著下调基因^[21]。经过多重检验校正后, 选择 $Q\text{-value} \leq 0.05$ 的差异基因进行 GO、KEGG 富集分析, 明确其主要参与的生化代谢途径、信号转导通路及生物学功能。

1.9.4 RT-qPCR 验证

为验证转录组结果的准确性, 采用实时荧光定量逆转录 PCR (real-time reverse transcription quantitative, RT-qPCR) 进行验证。菌株的总 RNA 使用 RNAiso Plus 方法提取, 逆转录反应使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 逆转录试剂盒。RT-qPCR 扩增体系(20 μ L): 2 \times SYBR Green Mix 10 μ L, 上、下游引物(5 μ mol/L)各 0.8 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 7.4 μ L。扩增程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 57 °C 退火 30 s, 共 35 个循环。引物信息见表 1。

1.10 数据分析方法

试验数据的统计分析借助 SPSS 27.0 软件完成, 以 $P=0.05$ 为差异具有统计学意义的判定标准, 分别采用单因素方差分析方法(analysis of variance, ANOVA)与独立样本 t 检验完成组间数据的差异显著性判定。

表1 RT-qPCR引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time reverse transcription quantitative PCR

Genes	Primer names	Primer sequences (5'→3')
<i>peg.1843</i>	1843-F	TGCCTCGCACCGTAATCTA
	1843-R	CCAGCACGTGACACAGCTT
<i>peg.1846</i>	1846-F	GAGCTGGTCCAGGCTGACC
	1846-R	CGAAGCATTGCCCTTGTGT
<i>peg.1847</i>	1847-F	CGAACAGGAACTCCACAC
	1847-R	TCAAGTAATCGACGACGG
<i>peg.5642</i>	5642-F	GCACCGGTGCTGGTACTG
	5642-R	GTCTGGCGAGCCGATCTT
<i>peg.5488</i>	5488-F	CAAGTCGGGGCTGGAGAA
	5488-R	GGCGTTGATGGTGGCAAC

2 结果与分析

2.1 菌株 DQ78 的筛选与鉴定

从武汉市东西湖污水处理厂的活性污泥中富集、分离、纯化得到 1 株能以 ETH 为唯一碳源生长的菌株，命名为 DQ78。该菌株在 40 h 内对初始浓度为 2 mmol/L 的 ETH 的降解率达到 100%。其菌落形态呈乳白色、圆形、边缘规则、表面光滑且凸起(图 1A)。电镜观察显示，该菌为革兰氏阴性菌，呈杆状或略弯曲，具端生鞭毛，有荚膜，细胞大小为(0.5–1.0) μm × (1.5–4.0) μm (图 1B)。生理生化鉴定(Biolog GENIII 系统)结果表明，菌株 DQ78 对 D-葡萄糖、D-果糖、D-纤维二糖、L-岩藻糖、L-鼠李糖、乳酸钠等碳源和利福霉素 SV、林可霉素、醋竹桃霉素、万古

霉素等抗生素表现为阳性反应，而对山梨糖醇、果胶、甲酸等表现为阴性反应(表 2)。基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析显示，该菌株与 *Pseudomonas huaxiensis* WCHPS060044 的相似性为 99% (图 1C)。依据该菌株的菌落形态、生理生化指标检测结果以及分子生物学鉴定数据，经综合分析判定，该菌株的分类地位为假单胞菌属(*Pseudomonas*)，并命名为 *Pseudomonas* sp. DQ78。

2.2 DQ78 菌株不同条件的生长情况

生长变化曲线是直观表征菌株在不同培养条件下生长动态规律的有效手段。本研究的生长曲线结果表明：在 0–15 h，菌株 DQ78 的 OD_{600} 值上升速率缓慢，此阶段为菌株的适应期；15–35 h 菌株进入对数生长期，菌体细胞快

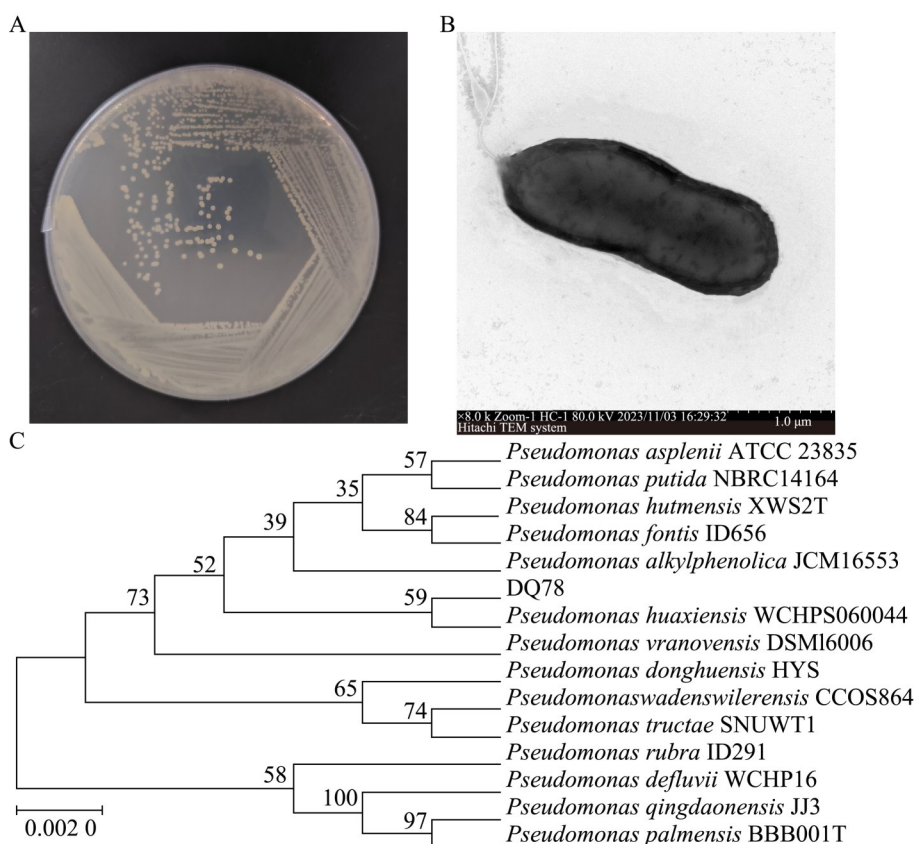


图1 菌株的筛选与鉴定

Figure 1 The screening and characterization of strain. A: The colony morphology; B: Transmission electron microscope; C: The phylogenetic evolutionary tree of 16S rRNA gene sequences in strain DQ78.

表2 菌株DQ78的Biolog GENIII微生物鉴定板底物利用检测结果

Table 2 Substrate utilization results of Biolog GENIII microbial identification plate for strain DQ78

Test item	Results	Test item	Results	Test item	Results	Test item	Results
Negative control	-	Inosine	-	Methyl pyruvate	w	α -D-glucose	+
D-fructose	+	L-rhamnose	-	Glycyl-L-proline	-	Gelatin	+
D-maltose	w	Dextrin	+	L-alanine	+	D-mannose	+
3-methyl glucose	w	Citric acid	+	L-aspartic acid	+	L-lactic acid	+
D-cellobiose	+	D-trehalose	+	L-arginine	+	D-galactose	w
L-fucose	+	Minocycline	+	Tetrazolium blue	+	Quinic acid	+
Sucrose	w	Gentiobiose	w	L-histidine	+	D-fucose	w
L-malic acid	+	<i>N</i> -acetyl neuraminic acid	w	L-galactonic acid lactone	-	<i>p</i> -hydroxy-phenylacetic acid	+
1% Sodium lactate	+	Nalidixic acid	+	L-serine	+	Bromo-succinic acid	w
Positive control	+	Stachyose	w	Lithium chloride	+	D-turanose	w
pH 5.0	+	Niaproof 4	+	Guanidine HCl	+	Lincomycin	+
pH 6.0	+	D-serine	+	Fusidic acid	+	Potassium tellurite	+
γ -amino-butyric acid	+	D-sorbitol	-	Tween-40	-	Pectin	-
α -D-lactose	w	D-sorbitol	w	D-galacturonic acid	w	D-raffinose	-
β -methyl-D-glucoside	w	L-pyroglutamic acid	+		+	D-lactic acid methyl ester	+
Glucuronamide	w	Myo-inositol	w	D-mannitol	w	β -hydroxy-D,L-butyric acid	+
D-salicin	w	Glycerol	+	D-glucuronic acid	-	α -keto-butyric acid	+
<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine	-	α -hydroxy-butyric acid	-	D-gluconic acid	+	D-fructose-6-PO ₄	+
D-glucose-6-PO ₄	+	Acetoacetic acid	-	Acetic acid	+	Propionic acid	+
<i>N</i> -acetyl-D-galactosamine	w	Mucic acid	+	Aztreonam	+	D-serine	+
D-aspartic acid	w	D-melibiose	+	D-saccharic acid	-	Formic acid	-
8% NaCl	+	Tetrazolium violet	+	Rifamycin SV	+	α -keto-glutaric acid	+
4% NaCl	+	Vancomycin	+	Troleandomycin	+	Sodium butyrate	+
1% NaCl	+	Sodium bromate	+	L-glutamic acid	+	D-malic acid	+

+: Positive; -: Indicates negative; w: Indicates weakly positive.

速分裂增殖 OD_{600} 值呈快速上升趋势; 35–45 h 菌株进入稳定期, 细胞增殖速率与死亡速率趋于平衡, 其 OD_{600} 值波动幅度较小, 整体维持稳定状态(图 2A)。最适生长温度试验表明(图 2B), 当温度为 19 °C 时, OD_{600} 值上涨缓慢, 菌株 DQ78 生长繁殖能力较弱; 当温度为 24–28 °C 时, OD_{600} 值稳步上涨, 菌株 DQ78 生长繁殖能力逐渐增强; 当温度为 32–37 °C 时, OD_{600} 值明

显下降, 显示高温明显抑制其生长; 说明菌株 DQ78 的最适生长温度为 28 °C 左右。在最适生长温度 28 °C 下进一步观察初始 pH 对其生长的影响(图 2C), 发现当培养基初始 pH 为 5.0–6.0 时, 菌株的生长增殖速率较慢, OD_{600} 值增加缓慢上升趋势平缓; 当初始 pH 为 7.0–9.0 时, 菌株生长态势良好, OD_{600} 值维持在较高区间; 尤为突出的是, 初始 pH 调至 8.0 时, 菌株 OD_{600} 值

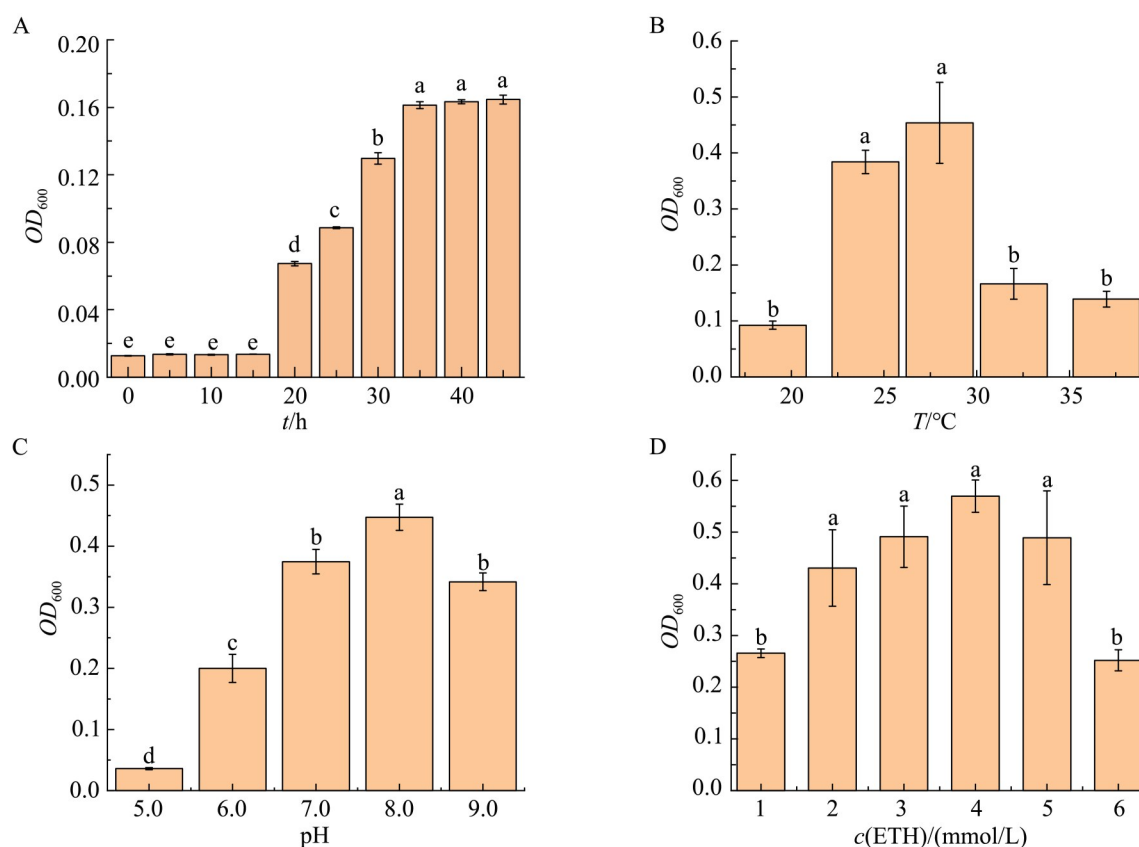


图2 菌株DQ78培养条件

Figure 2 Culture conditions for strain DQ78. A: The growth of strain; B: The optimization of temperature; C: The optimization of pH; D: The optimization of initial ETH concentration. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

达到最大，由此可判定该菌株的最适生长 pH 为 8.0 左右。此外，不同初始 ETH 浓度试验结果表明(图 2D)，当初始 ETH 浓度为 1–4 mmol/L 时，菌株 DQ78 的 OD_{600} 值随初始 ETH 的浓度升高而增加；当初始 ETH 浓度为 4–6 mmol/L 时，菌株生长代谢受到显著抑制， OD_{600} 值随浓度升高呈逐步下降趋势；在该浓度范围内，初始 ETH 浓度为 4 mmol/L 时，菌株的 OD_{600} 值达到最大值，表明最适生长初始 ETH 浓度为 4 mmol/L 左右，且高浓度 ETH 对其生长具有明显抑制作用。

2.3 菌株 DQ78 降解条件的优化

为了探究环境条件对菌株 DQ78 降解 ETH 效率的影响，本研究系统考察了温度、pH 及

ETH 初始浓度等因素，并确定了菌株 DQ78 降解 ETH 的最佳条件。如图 3A 所示，在温度为 28 °C、初始 pH 8.0 的最优生长条件下，菌株 DQ78 对 4 mmol/L ETH 具备高效降解能力，可在 40 h 内实现该底物的完全降解。培养至 20–35 h 时，ETH 降解率已达 90%；进入 35–40 h 阶段后，体系中残余的 ETH 被彻底降解。在不同初始 pH 条件下(图 3B)，ETH 降解率呈现不同的降解特性，当初始 pH 为 7.0–9.0 的中性至弱碱性区间时，菌株对 ETH 的降解效率维持在 95% 以上的较高水平，其中 pH 8.0 为最优降解 pH，此时 ETH 可被完全降解；而当 pH 降至 5.0–7.0 的酸性区间时，ETH 降解率出现显著下降，表明参与 ETH 降解的关键活性物质在中性

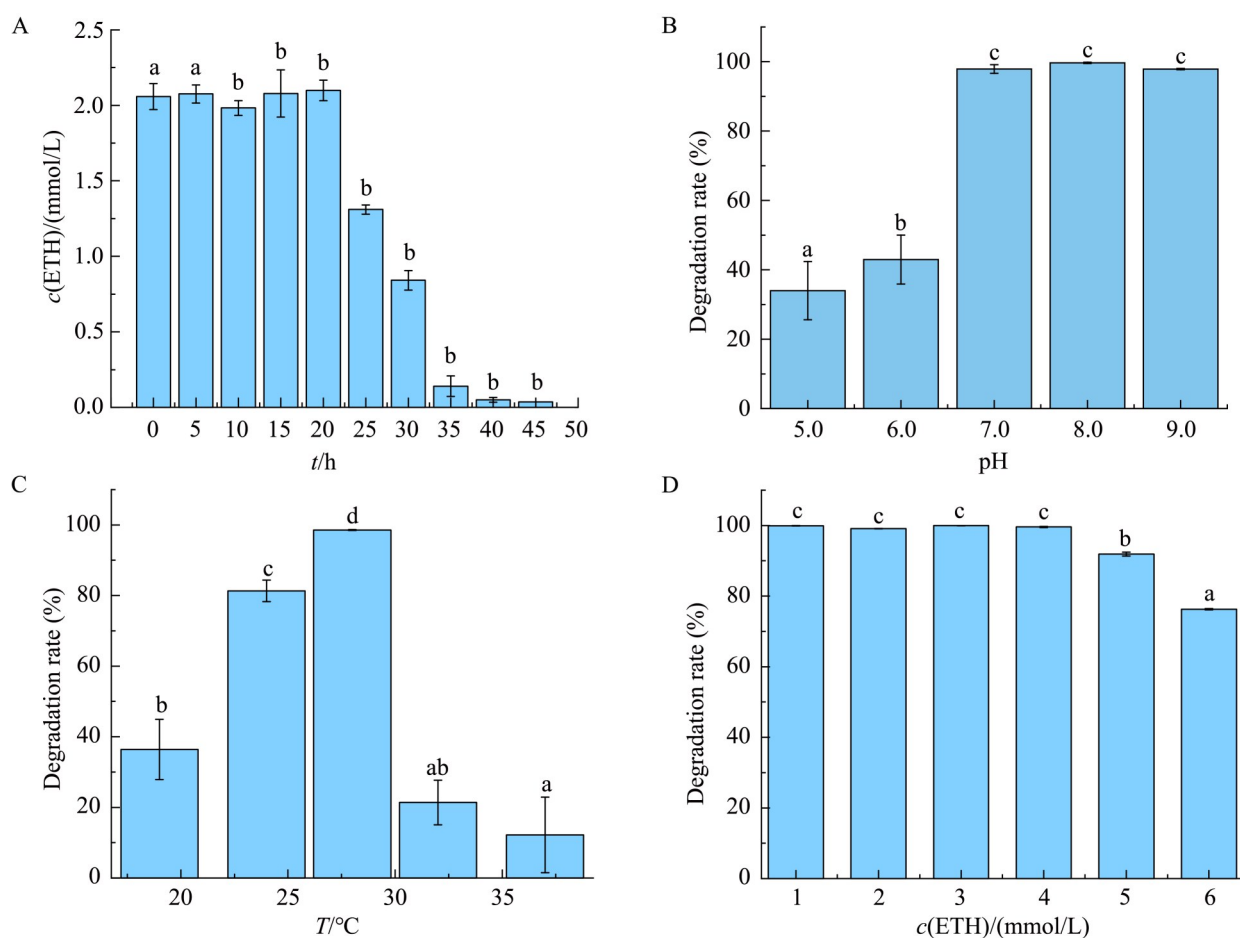


图3 菌株DQ78降解ETH的最适条件

Figure 3 Optimization of ETH degradation conditions by strain DQ78. A: Optimal degradation time; B: Optimal degradation pH; C: Optimal degradation temperature; D: Optimal degradation ETH initial concentration. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

及弱碱性环境下活性最高, 酸性条件则会明显抑制其功能发挥。最适降解温度的试验结果表明, 当温度在 19–37 °C 范围内, 菌株 DQ78 对 ETH 的最适降解温度为 28 °C, 该条件下菌株可在 40 h 内将 2 mmol/L ETH 完全降解, 降解率达 100%; 其次为 24 °C, 降解率约为 80%; 当温度进一步升高至 32 °C 和 37 °C 时, 菌株的降解能力大幅衰减, 40 h 内 ETH 的降解率分别约为 20% 和 15% (图 3C), 证实高温环境对菌株的 ETH 降解能力具有显著抑制作用。此外, 随着底物初始浓度的升高, 菌株的降解率呈逐步下降趋势。当 ETH 初始浓度为 1–4 mmol/L 时,

菌株展现出最优降解效能, 降解率可达 99% 左右, ETH 初始浓度为 6 mmol/L 时, 降解率则降至 75% (图 3D), 表明较高初始浓度的 ETH 抑制了菌株的降解效率。

2.4 ETH 降解产物及降解途径分析

本研究利用超高效液相色谱-串联质谱 (UHPLC-MS) 鉴定出了 ETH 及其降解产生的 3 种主要降解产物 (图 4): 4-乙氧基苯-1,2-二醇 (P1)、(2E,4Z)-3-羟基-2,4-己二烯二酸 (P4)、琥珀酸 (P6)。通过分析降解产物的化学结构, 可以推测出 ETH 的降解途径: 首先 ETH ($[M+H]^+$, $m/z=138.12$) 发生脱氨和 1,2 位羟基化, 生成 P1 ($m/z=$

155.00)。P1 通过脱乙基或者邻位开环反应分别生成 1,2,4-苯三酚(P2)、(2Z,4Z)-3-乙氧基-2,4-己二烯二酸(P3); P2 和 P3 通过邻位开环和脱乙基生成具有烯醇结构的 P4 ($[M+Na]^+$, $m/z=181.09$); P4 进一步发生酮式-烯醇式互变异构生成(Z)-4-羧基己-2-烯二酸(P5); 最后, P5 通过水解、脱羧等反应生成 P6 ($[M+H]^+$, $m/z=117.10$), 最终进入三羧酸循环。

2.5 假单胞菌株 DQ78 在 ETH 胁迫环境下的转录组学分析

2.5.1 转录组的数据质量评估

采用 Illumina NovaSeq 高通量测序平台, 对分别在对乙氧基苯胺(ETH)胁迫条件与琥珀酸(CK)条件下培养的菌株 DQ78 进行转录组测序, 共完成 6 个样本的分析, 获得总计 19.65 Gb 的 clean data, 每个样本数据量均不低于 3.02 Gb。

试验组(ETH)的 3 个样本分别得到 21 010 000、21 886 876 和 24 710 790 条有效序列; 对照组(CK)的 3 个样本分别为 21 830 080、22 595 202 和 22 595 202 条有效序列。经参考基因组比对及过滤后, 试验组保留 20 757 944、21 617 452 和 24 411 144 条高质量序列, 对照组则保留 21 596 784、22 215 930 和 23 822 672 条序列(表 3)。

为保障后续分析的可靠性, 仅选用能够唯一比对至基因组位置的序列(unique matched reads)进行后续研究。质量评估结果显示(表 3), 试验组中完全匹配至基因组的序列比例(genome mapped ratio)均高于 98.90%, 对照组也达 93.78% 以上; 唯一比对 reads 占 clean reads 的比例(unique matched reads ratio)在试验组中超过 98.29%, 对照组中超过 92.56%。此外, 所有样本的 Q30 值介于 95.05%–95.59% 之间, Q20 平

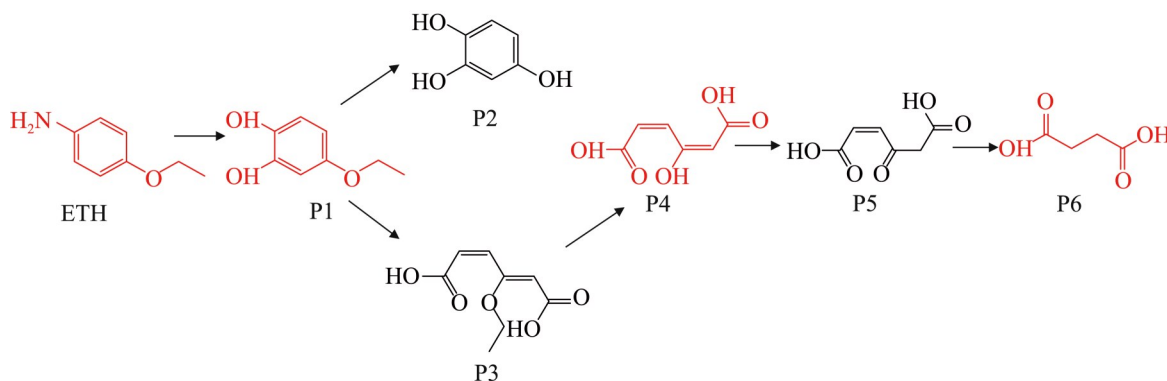


图4 ETH生物降解产物及降解途径

Figure 4 Biodegradation products and degradation pathways of ETH. The compounds highlighted in red in the figure were identified by UHPLC-MS, while the black compounds remain unidentified.

表3 样品与参考基因组比对结果

Table 3 RNA-seq data for reads number in two samples

Sample name	Raw reads	Total reads	Genome mapped reads	Unique matched reads	Clean Q20 (%)	Clean Q30 (%)
ETH-1	21 010 000	20 757 944	20 530 550 (98.90%)	20 402 526 (98.29%)	98.46	95.29
ETH-2	21 886 876	21 617 452	21 427 157 (99.12%)	21 300 369 (98.53%)	98.42	95.14
ETH-3	24 710 790	24 411 144	24 152 655 (98.94%)	23 994 068 (98.29%)	98.38	95.05
CK-1	21 830 080	21 596 784	20 252 714 (93.78%)	19 990 568 (92.56%)	98.53	95.42
CK-2	22 595 202	22 215 930	20 967 813 (94.38%)	20 601 989 (92.74%)	98.60	95.58
CK-3	22 595 202	23 822 672	22 602 407 (94.88%)	22 224 140 (93.29%)	98.58	95.59

均值范围为 98.38%–98.60%。上述指标综合表明, 本次转录组测序数据质量良好, 符合后续生物信息学分析的基本要求。

2.5.2 基因差异表达分析

使用 RSEM 软件对样本间基因表达水平进行定量分析, 以 TPM 作为表达量指标。结果显示, 在 ETH 处理组中共检测到 5 456 个基因表达, 对照组(CK)中则为 5 709 个基因(图 5A)。利用 RNA-seq 数据的主成分分析 (principal component analysis, PCA)判断组间聚类程度及样品间的相关性^[22]。如图 5B 所示, ETH 组与 CK 组样本在 PCA 图中分布距离较远, 显示两组间基因表达谱存在显著差异; 而组内生物学重复聚集紧密, 表明实验重复性良好, 满足差异分析要求。

基于 DESeq2 对 ETH 组、CK 组的样本进行

分析, 以 $|\log_2 FC| > 1$ 且 $FDR < 0.05$ 为标准, 共筛选出 3 380 个差异表达基因(DEGs), 其中 1 609 个基因的转录水平显著上调, 1 771 个基因的转录水平显著下调(图 5C)。这表明菌株 DQ78 在 ETH 胁迫条件下存在一个相对完整的适应系统, 通过调控一系列基因的表达来适应环境的变化。下调基因数大于上调基因数, 推测 ETH 可能在一定程度上抑制了菌株的部分基础代谢过程, 同时激活了特定胁迫响应机制以协助细胞适应环境压力。

2.5.3 差异表达基因的 GO 富集分析

为深入解析假单胞菌 DQ78 在 ETH 胁迫下的转录调控特征, 对差异表达基因(DEGs)进行了 GO 功能富集分析, 分别从 3 个类别对上下调基因进行功能归类包括细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function,

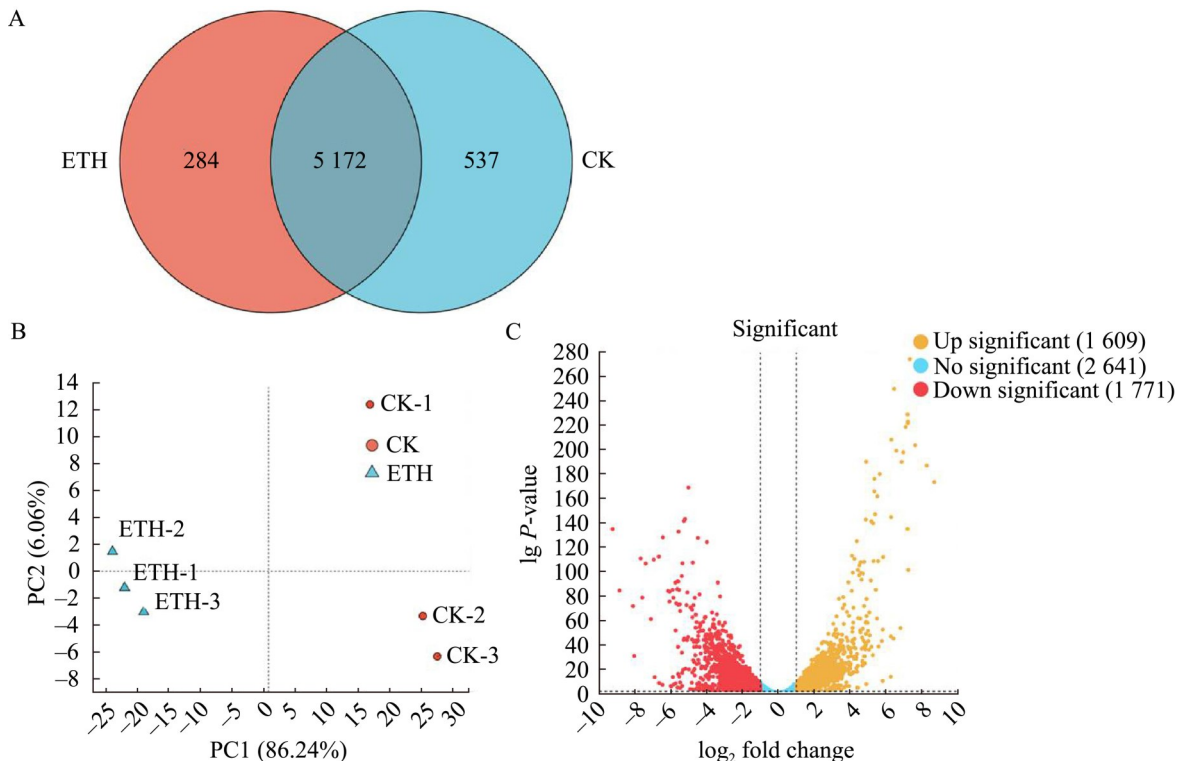


图5 菌株DQ78在不同处理下表达量分析

Figure 5 Expression analysis of strain DQ78 under different treatments. A: Venn diagram of DEGs; B: PCA shows distances between samples from different groups; C: Volcano plot of differentially expressed genes induced by ETH and succinic acid, respectively.

MF)和生物过程(biological process, BP)。上调 DEGs 显著富集的 GO terms 共有 57 个。在生物过程中, 主要富集于支链氨基酸代谢过程(branched-chain amino acid metabolic process)、细菌型鞭毛依赖的细胞运动(bacterial-type flagellum-dependent cell motility)和支链氨基酸生物合成过程(branched-chain amino acid biosynthetic process); 在分子功能层面, 高度富集的 terms 包括三价铁结合(ferric iron binding)、细胞骨架运动活性(cytoskeletal motor activity)和氧化还原酶(oxidoreductase activity)等; 在细胞组分方面, 集中于细菌型鞭毛基体(bacterial-type flagellum basal body)、TAT 蛋白转运复合物(TAT protein transport complex)和切酶修复复合物(excinuclease repair complex) (图 6A)。这些结果表明, 菌株在 ETH 胁迫下可能通过增强支链氨基酸代谢以提供能量与前体物质, 提升运动能力以趋近底物, 并借助铁离子结合与氧化还原酶系统参与 ETH 的初始氧化或共代谢降解。

GO 功能富集分析结果显示, 下调 DEGs 共显著富集到 58 个 GO terms。从功能分类来看: 在生物过程层面, 富集条目主要涵盖肽生物合成过程(peptide biosynthetic process)、肽代谢过程(peptide metabolic process)和蛋白质的翻译(translation)等; 分子功能层面, 核心富集方向为 rRNA 结合(rRNA binding)、结构分子活性(structural molecule activity)和核糖体的结构成分(structural constituent of ribosome)等; 细胞组分层面, 显著富集的结构则包括细胞内的细胞器(intracellular organelle)、核糖体(ribosome)和核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complex)等(图 6B)。此转录响应表明菌株为应对 ETH 胁迫, 可能主动抑制了部分蛋白质合成与核糖体组装等基础代谢过程, 通过抑制非必需的高耗能过程, 将有限的能量和物质重新分配至与胁迫适应及降解功能相关的关键通路, 从而更好地应对外界环境胁迫。

2.5.4 差异表达基因的 KEGG 富集分析

为了进一步了解假单胞菌 DQ78 在 ETH 胁迫条件下 DEGs 参与的代谢通路, 本研究基于 KEGG 数据库对差异表达基因(DEGs)进行了通路富集分析。结果显示, 在 ETH 胁迫条件下, 共筛选到 183 个上调 DEGs 显著富集的通路和 184 个下调 DEGs 显著富集的通路(图 7A、7B); 上调 DEGs 主要富集于鞭毛组装(flagellar assembly)和硫代谢(sulfur metabolism)等通路。鞭毛组装通路的激活表明菌株可能通过增强运动性以趋近 ETH 或逃离高胁迫区域; 而硫代谢的增强则可能为细胞解毒过程提供必需的硫源, 并参与抗氧化物质(如谷胱甘肽)的合成, 共同协助细胞抵御 ETH 引起的氧化损伤。下调 DEGs 主要富集于核糖体(ribosome)和胞外生物合成(exopolysaccharide biosynthesis)等通路。核糖体通路的抑制反映出菌株在 ETH 胁迫下主动降低蛋白质合成水平以减少能量消耗; 胞外生物合成的下调则提示其可能缩减荚膜或生物被膜等结构的合成, 将有限资源重新分配至与胁迫生存更密切相关的核心过程, 如解毒酶系表达、氧化应激应答及 DNA 修复等。在对乙氧基苯胺的胁迫压力下, 菌株 DQ78 的正常生命活动与分子功能受到明显抑制, 菌株主动启动适应性调控机制以调整自身生理代谢进程。本研究中显著富集的各类生物学过程正是介导菌株 DQ78 响应对乙氧基苯胺胁迫、实现自我保护的核心途径。

2.5.5 ETH 胁迫下解毒与防御机制分析

在 ETH 胁迫条件下, 菌株 DQ78 中芳香族化合物代谢通路的关键基因表达呈现系统性上调(图 8), 包括双加氧酶、单加氧酶、去甲基化酶、脱氢酶、水解酶、脱羧酶和辅酶等。其中涉及芳香环初始氧化及开环反应的双加氧酶与单加氧酶类基因显著高表达, 包括芳香环羟基化双加氧酶(Peg.1846、Peg.1847)、儿茶酚 1,2-双加氧酶(Peg.1850)、4-羟基苯丙酮酸双加氧酶(Peg.1895)、植物酰辅酶双加氧酶(Peg.1598)、荧

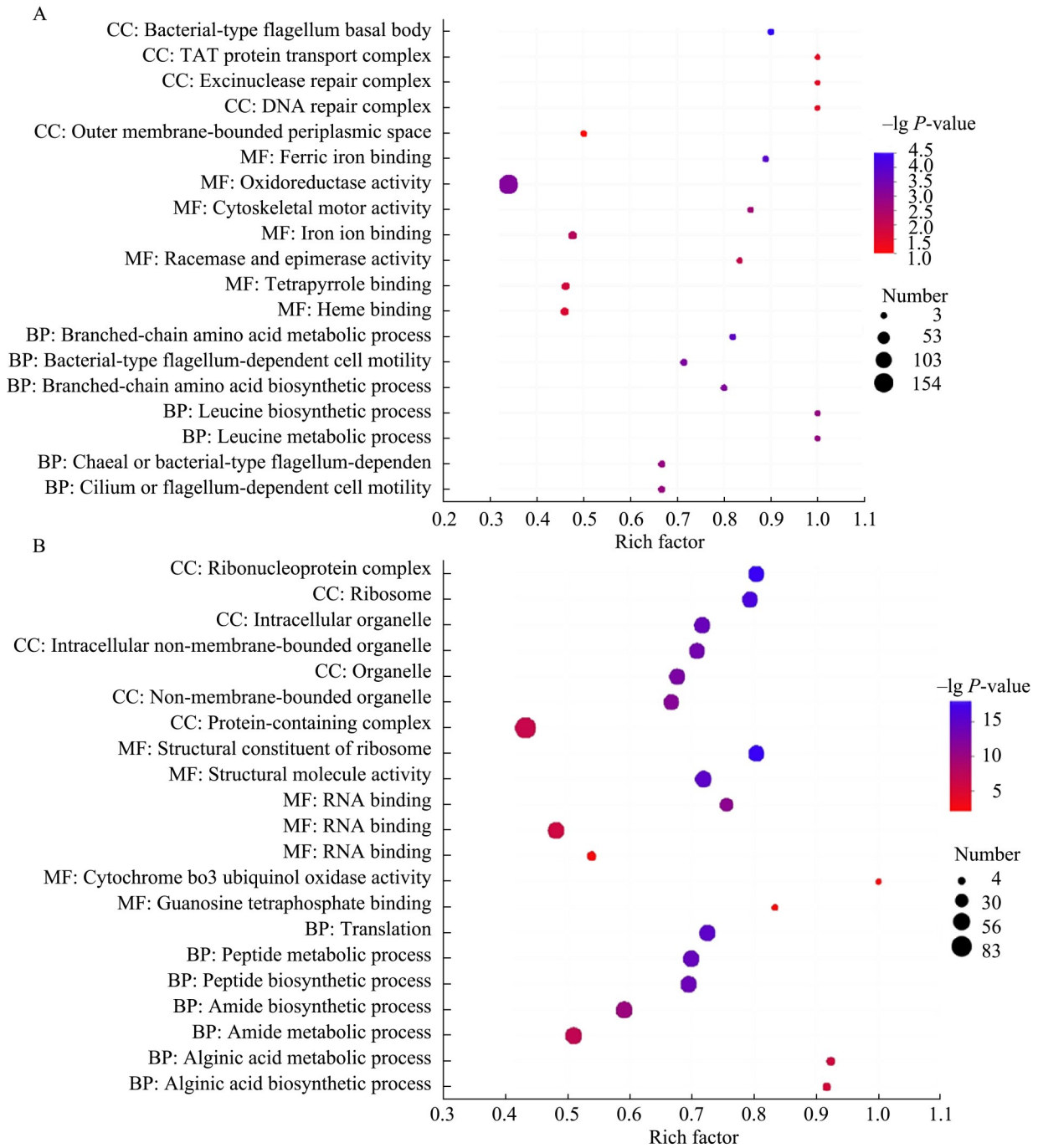


图6 差异表达基因的GO富集分析

Figure 6 GO enrichment analysis of DEGs. A: GO enrichment analysis of up-regulated DEGs; B: GO enrichment analysis of down-regulated DEGs. CC: Cellular component; MF: Molecular function; BP: Biological process.

光素酶样单加氧酶(Peg.75)、烷基磺酸单加氧酶(Peg.372)。同时, 参与中间产物代谢的多种酶类也普遍上调, 如对羟基苯甲酸羟化酶(Peg.3989)、

香草酸 *O*-脱甲基酶(Peg.5945、Peg.4679), 乙醇脱氢酶(Peg.1843)、有氧甘油-3-磷酸脱氢酶(Peg.949)、甲基丙二酸半醛脱氢酶(Peg.1876)、

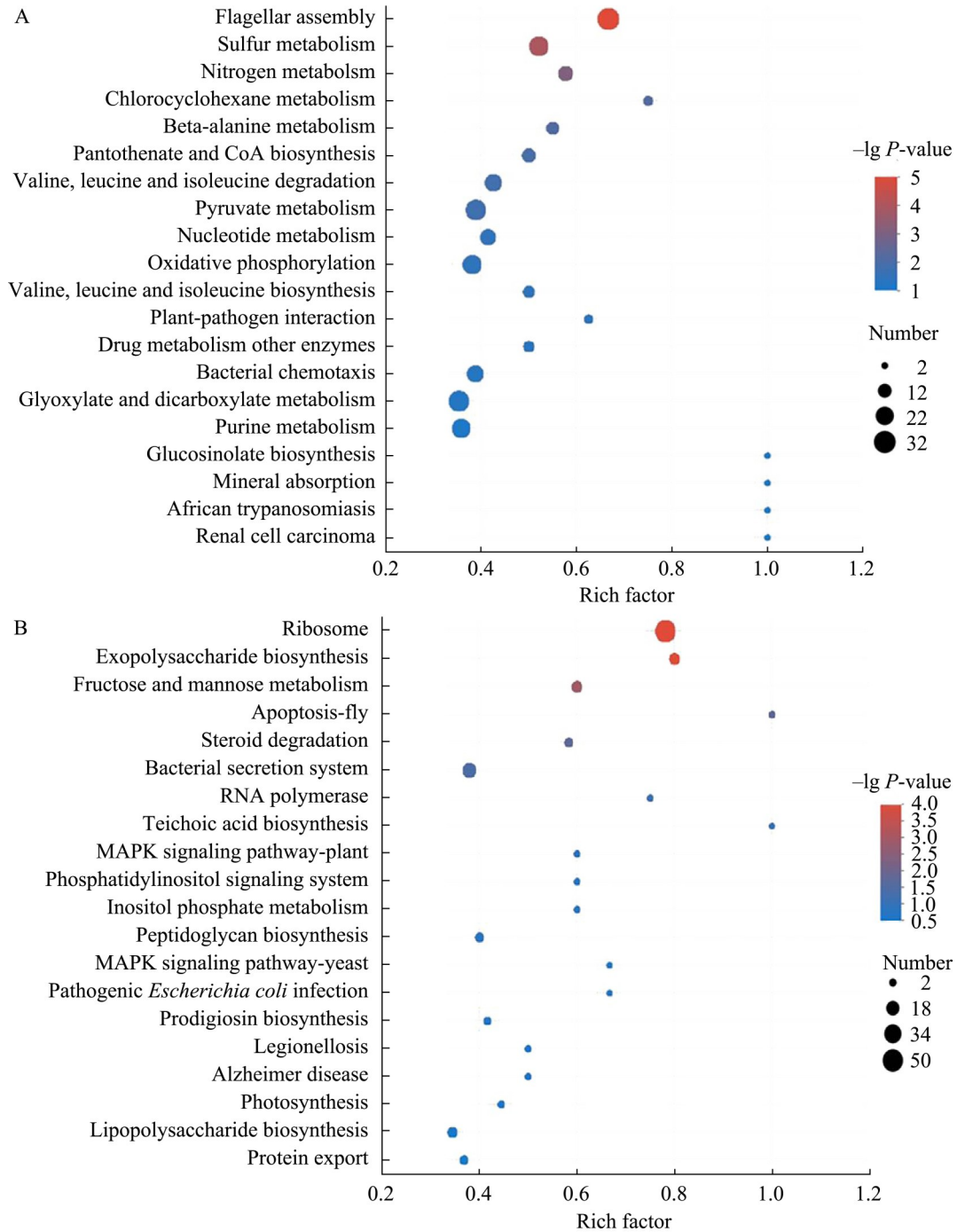


图7 差异表达基因的KEGG富集分析

Figure 7 KEGG enrichment analysis of DEGs. A: KEGG enrichment analysis of up-regulated DEGs; B: KEGG enrichment analysis of down-regulated DEGs.

醛脱氢酶(Peg.1420、Peg.3883), β -酮己二酸烯醇内酯水解酶(Peg.5642)、 α/β 家族水解酶(Peg.1228), 羧粘康内酯脱羧酶家族蛋白

(Peg.5488、Peg.541)、4-羧基琥珀酰内酯脱羧酶(Peg.5641)。此外, 辅酶 PQQ 合成相关蛋白(Peg.2582、Peg.2583)的表达也同步增强, 表明

其在反应中作为关键辅因子支持能量与电子传递。上述基因的协同表达模式共同构建了一条完整的 ETH 微生物降解途径, 即菌株 DQ78 可能通过“氧化开环-中间产物转化-彻底矿化”的级联反应降解 ETH: 双加氧酶/单加氧酶先催化 ETH 芳香环羟基化与开环, 去甲基化酶参与乙氧基的脱除, 脱氢酶、水解酶及脱羧酶则进一步转化开环产物, 辅酶则为反应供能, 最终实现 ETH 的彻底矿化。

除代谢相关基因外, 多个调控与防御相关

基因也显著上调, 包括一些信号感知和转导蛋白 (如 Peg. 4155、Peg. 2797)、转录因子 (如 Peg. 1849、Peg. 4245), 转运蛋白 (如 Peg. 2126、Peg. 2012) 和氧化防御相关的过氧化物酶 (如 Peg. 5684、Peg. 3980) 等 (图 8), 这些基因可能也参与对乙氧基苯胺胁迫时的防御和解毒机制。这些基因可形成协同调控网络: 信号蛋白感知 ETH 信号并启动转导, 转录因子调控降解基因表达, 转运蛋白介导底物和产物跨膜运输, 过氧化物酶清除氧化应激产物, 共同支撑菌株抗

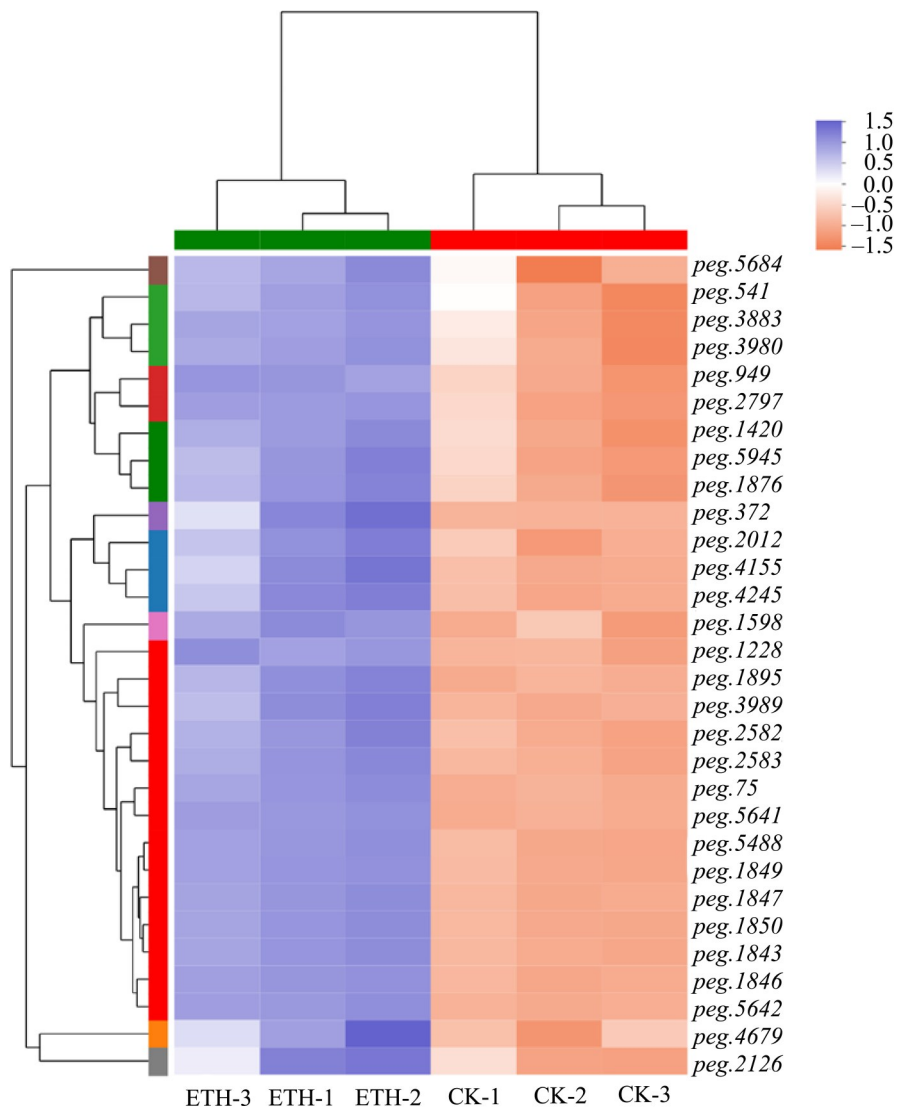


图8 ETH胁迫下解毒与防御相关基因的表达

Figure 8 Expression of detoxification and defense-related genes under ETH stress.

逆与降解功能。

2.5.6 转录组测序结果的验证

为了验证转录组数据的可靠性,本研究选取 5 个与 ETH 降解及胁迫响应相关的候选基因进行 RT-qPCR 分析。所选基因包括参与芳香环羟基化与开环的芳香环羟基化双加氧酶基因 (*peg.1846*、*peg.1847*)、催化内酯键水解的内酯水解酶基因(*peg.5642*)、参与氧化反应的脱氢酶基因(*peg.1843*), 以及响应氧化胁迫的过氧化氢酶基因(*peg.5488*)。结果显示,上述基因在 ETH 胁迫下的表达量均显著上调,增幅约为 5–11 倍(图 9),其表达趋势与转录组测序结果高度一致。该验证结果不仅证实了转录组数据的可靠性,也进一步表明菌株 DQ78 在 ETH 胁迫中激活了包括芳香环开环、中间产物转化与氧化防御在内的多类功能基因,共同参与 ETH 的降解与胁迫适应过程。

3 讨论

对乙氧基苯胺作为一种广泛应用于化工与制药工业的潜在致癌物质,已在多个国家被列为限用或禁用的有害物质。因此,开发高效、

低成本的微生物降解技术具有重要现实意义。本研究采用唯一碳源筛选法,以 ETH 作为目标底物,从活性污泥样品中经富集、分离与纯化,获得 1 株具有高效降解能力的假单胞菌 DQ78;该菌株在 28 °C 的适宜培养温度下连续培养 40 h,即可完成对 ETH 的完全生物降解。假单胞菌属 (*Pseudomonas*)作为一种革兰氏阴性杆菌,在自然界中分布广泛,具有较强的环境适应性与降解多样性。该属自 Winslow 等建立“假单胞菌科”并于 1980 年获《国际细菌命名法规》正式确认以来^[23],已有多个菌株被报道可降解多种胺类污染物。例如,Zhu 等^[24]发现假单胞菌 CA-1 可完全降解对氯苯胺。Jun 等^[25]从湖水沉积物样品中分离到的假单胞菌 X1 和 X2 发现具有很强的氨氮降解能力。假单胞菌作为环境修复模式菌株,其降解 ETH 的研究可填补专属功能菌株空白。ETH 作为高毒性污染物,常用作染料和医药中间体,生产使用中存在潜在污染风险。其降解研究不仅初步揭示了乙氧基侧链降解的分子机制,完善了芳香胺降解理论,还能为同类污染物治理提供技术范式与基因靶点,兼具现实治理价值与科学应用意义。

不同的培养条件会影响菌株的生长活性,当菌株生长环境适宜、营养条件充分时,菌株生长活性高才能充分降解污染物^[26]。因此,本研究系统优化了菌株 DQ78 在不同时间、温度及 pH 条件下的生长与降解性能,明确了其最适降解环境。

微生物的自适应过程涉及基因表达调控,通过激活或抑制特定基因的表达使微生物适应不同的环境条件^[27-28]。本研究通过对琥珀酸和 ETH 处理条件下菌株 DQ78 的转录组分析对比发现,共有 3 380 个 DEGs,其中 1 609 个基因上调,1 771 个基因下调。进一步分析发现,这些 DEGs 可明确归为两大类:一类是环境胁迫适应相关基因,涵盖能量代谢、氧化还原、胞外聚合物生成、运动趋化及非必需蛋白合成调控相关基因;另一类是芳香族化合物降解直接相

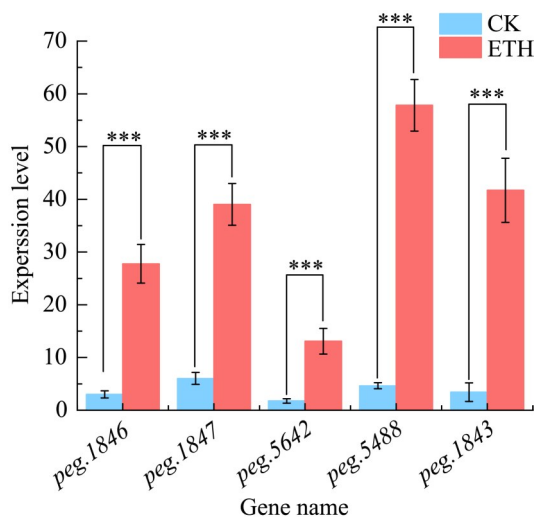


图9 RT-qPCR结果验证

Figure 9 Validation of RT-qPCR results. *** indicates that the P -value<0.001.

关基因, 包括双加氧酶基因、脱羧酶基因、水解酶基因等关键降解酶编码基因。菌株 DQ78 通过协同芳香族化合物代谢、运动趋化、调控能量代谢、氧化还原及胞外聚合物生成等多条通路, 并适度精简非必需蛋白合成, 构建了一个高效降解 ETH 及应对 ETH 胁迫的分子应答网络。

在 ETH 胁迫条件下, 菌株 DQ78 启动了一系列适应性应激响应。除增强能量代谢、氧化还原平衡以及胞外聚合物合成等基础防御机制外, 本研究特别观察到鞭毛组装通路被特异性显著激活。这一现象表明, 菌株可能通过调控鞭毛合成以主动规避高浓度 ETH 环境。刘煜耿等^[29]指出细菌趋化系统依赖鞭毛实现“浓度梯度感知-定向运动”的偶联机制, 而该通路的激活由顶端调节因子 FlhDC 调控^[30]。此外, Gupta 等^[31]发现微生物捕获污染物的分子转运机制是污染物生物修复的重要前提。基于此, 推测在 ETH 胁迫下, 菌株 DQ78 可能通过激活 FlhDC 表达, 启动鞭毛合成的级联反应, 进而借助鞭毛介导的趋化行为主动迁移至 ETH 浓度较低的区域。这一趋化能力不仅有助于菌株逃离毒性胁迫, 也可能促进其对污染物的有效捕获与定位, 为后续降解反应提供底物基础。因此, 鞭毛系统的激活不仅是应激行为的具体体现, 也可能在微生物修复过程中具有重要的生态功能, 即通过趋化策略实现污染物定位与降解的协同。

在适应胁迫环境后, 菌株特异性上调芳香族化合物降解相关基因, 其中双加氧酶基因、脱羧酶基因及水解酶基因显著高表达, 可分别催化 ETH 的苯环羟基化、侧链脱羧及环断裂等关键步骤, 直接推动 ETH 的分步代谢。这表明菌株在保障存活的同时, 精准启动针对 ETH 的降解通路, 实现“胁迫适应-高效降解”的协同调控。此外, FlhDC 对鞭毛组装的核心调控作用及降解关键酶基因的特异性表达特征, 可作为后续优化 ETH 污染生物修复效率的潜在靶点。

尤为关键的是, 芳香族化合物代谢通路中

多个关键基因显著上调, 包括双加氧酶、单加氧酶、去甲基化酶、脱氢酶、水解酶、脱羧酶及相关辅酶合成基因。这些酶基因与辅酶基因的协同上调, 暗示其通过催化芳香环氧化、官能团转化等步骤接力降解 ETH, 构成核心代谢网络。已有研究表明, 这些酶基因在芳香族化合物降解中具有重要作用。例如, Qiu 等^[32]发现, 在面对不同多环芳烃化合物时萘双加氧酶显著上调, 并参与多种芳香族化合物的催化氧化, 如萘、菲、芴等。双加氧酶的存在显著提高了细菌对复杂芳香族化合物的降解效率。此外, 某些细菌通过特定的去甲基酶作用可降解各种木质素相关化合物, 产生邻二醇, 并释放甲醇或甲醛等^[33]。刘丽娟等^[34]研究也表明单加氧酶对芳香族化合物的催化具有重要意义。水解酶能够帮助将复杂的底物分解为简单的分子, 从而促进芳香化合物的降解和代谢^[35]。在面对芳香化合物污染时, 脱羧酶能够催化芳香羧酸脱去羧基, 生成相应的芳香烃或其他中间代谢产物, 将有害物质转化为无害或低毒的物质^[36]。然而, 辅酶也参与多种生物化学反应, 促进芳香化合物的转化和降解^[37]。本研究中上述各类酶及辅酶基因的上调表达模式, 与已报道的芳香族化合物降解机制高度契合, 进一步佐证其通过协同催化构建 ETH 降解通路。

截至目前, 关于 ETH 生物降解的直接研究尚未见文献报道, 其具体降解路径、关键功能酶及功能菌群特征仍缺乏系统的科学数据支撑。然而, 鉴于 ETH 与苯胺在结构上高度相似, 均为芳香胺类化合物, 其生物降解过程可参考苯胺的已知途径进行合理推测: 首先, 微生物分泌的单加氧酶或双加氧酶催化苯环上乙氧基的脱烷基化反应生成羟基或直接去除乙氧基, 或直接对芳香环进行羟基化活化^[38]; 随后, 在环羟基氧化酶的特异性催化下, 于苯环邻位或对位引入羟基官能团, 转化为邻苯二酚(catechol)、原儿茶酸(protocatechuic acid)等中心代谢中间体^[39]; 最终, 这些中间体通过邻位或对位开环

途径被进一步降解, 逐步矿化为二氧化碳、水和氨等无机物, 完成生物转化过程。上述基于结构相似性的代谢路径推测, 为开展 ETH 高效降解菌筛选、降解机制解析及代谢产物鉴定等研究提供了重要的理论参考框架, 为该菌株高效降解 ETH 的功能特性提供了有力的基因层面支撑。菌株 DQ78 可能通过“芳香环羟基化—开环—官能团修饰—彻底矿化”的级联反应实现 ETH 的降解, 其代谢框架与已知的苯胺好氧降解机制高度吻合。综合本研究转录组分析与已有报道, 可进一步明确芳香族化合物代谢通路中多种功能基因在 ETH 降解中的协同作用, 为解析 ETH 生物降解机制提供了转录层面的支撑。

本研究通过整合转录组与质谱分析数据, 初步揭示了 ETH 的分子降解机制。在降解产物结构鉴定层面, 本研究受限于检测技术与产物特性, 尚未实现全产物的精准结构解析: 产物 P2、P3 浓度低于超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS)的检测下限, 仅能通过分子通式比对及同属菌株代谢规律分析, 初步判断其为苯三酚类与己二烯二酸类衍生物, 尚缺乏核磁共振波谱($^1\text{H-NMR}$ / $^{13}\text{C-NMR}$)的结构确证; 另一方面, 对开环后的小分子未通过衍生化处理与标准品保留时间比对完成定性, 无法区分其同分异构体的构型差异如产物 P4、P5, 导致产物的代谢归宿尚未完全明确。后续将采用制备型高效液相色谱对微量中间体进行靶向富集, 结合高分辨率质谱(HRMS)与核磁波谱完成结构精准鉴定; 利用 ^{13}C 标记的对乙氧基苯胺开展示踪实验, 追踪碳元素在代谢网络中的流向, 最终形成的完整降解途径验证体系, 为对乙氧基苯胺的生物修复技术提供更坚实的理论支撑。

本研究通过转录组分析筛选出了一些潜在的关键基因, 如 *peg.1846*、*peg.1847*、*peg.1850*, 但由于野生型菌株中固有的限制修饰系统, 未能通过基因敲除和功能回补等实验直接验证相关基因在降解途径中的具体功能, 这构成了当前研究的主要局限。为克服这一技术障碍, 后

续工作将采用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建精准突变株, 或尝试在敲除宿主限制修饰系统的基础上进行框内缺失突变。值得指出的是, 本研究尝试对候选基因进行异源表达时, 其在体外对 ETH 及其中间代谢物均表现出显著的催化活性(数据未显示)。基于上述结果, 后续研究将重点解析相关酶的催化特性与动力学参数, 系统阐明其在 ETH 降解途径中的具体作用, 从而完善 ETH 的分子降解机制模型。

本研究以假单胞菌 DQ78 为对象, 在 ETH 生物降解领域取得了重要进展, 但也存在明确的局限。本研究结果发现: 一是填补了 ETH 降解研究的空白, 通过整合转录组与质谱数据构建了“芳香环羟基化—开环—官能团修饰—矿化”的级联代谢框架, 并阐明了多类功能酶基因的协同调控模式; 二是揭示了独特的调控机制, 发现菌株可通过 FlhDC 调控鞭毛组装, 实现“毒性规避+底物捕获”的趋化功能, 从而建立了“胁迫适应-底物定位-高效降解”的协同调控网络。然而, 该研究仍存在若干不足, 例如降解产物缺乏核磁共振确证、关键基因的体内功能未经验证、碳流向尚未追踪等。此外, 受限于菌株耐受阈值、基因编辑技术手段以及原位验证的缺失, 其在工程化应用与深层机制解析方面仍面临显著挑战。

4 结论

本研究从活性污泥筛选分离出具有 ETH 高效降解能力的菌株 DQ78, 鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。菌株 DQ78 以 ETH 为唯一碳源生长。最佳生长降解条件为 pH 8.0、ETH 初始浓度 1–4 mmol/L、温度 28 °C, 降解率可达 100%。通过 RNA-seq 转录组分析发现, 在 ETH 胁迫条件下, 共有 3 380 个 DEGs, 其中 1 609 个上调基因和 1 771 个下调基因, GO、KEGG 富集分析表明, 差异基因主要富集于芳香族化合物代谢、能量代谢、运动趋化和氧化应激响应等通路, 揭示了菌株通过重构代谢网络、调整

能量分配策略来应对 ETH 胁迫和主动降解 ETH。为开发 ETH 污染的生物修复技术提供了优良菌种资源和理论依据。然而, 研究仍存在一些不足: 首先, ETH 降解过程中的中间产物尚未完全鉴定, 降解途径有待进一步验证; 其次, 虽然通过转录组分析筛选出潜在的关键降解基因, 但其具体功能仍需通过基因敲除和异源表达等实验加以确认; 此外, 菌株在实际污染环境中的应用效果及其生态安全性仍需进一步评估。后续研究将围绕上述问题展开以完善 ETH 生物降解的理论体系, 推动其在实际修复中的应用。

作者贡献声明

邱顺达: 研究构思与设计, 论文撰写与修改; 周正蓉: 实验操作与数据分析; 杨宇航: 实验操作; 刘二元: 数据收集处理; 闫达中: 数据分析; 邱东茹: 指导文章撰写与修改; 晁红军: 数据整理; 戴景程: 论文审阅和修改, 基金获取。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Gheni SA, Ali MM, Ta GC, Harbin HJ, Awad SA. Toxicity, hazards, and safe handling of primary aromatic amines[J]. ACS Chemical Health & Safety, 2024, 31(1): 8-21.
- [2] Harmon AC, Carroll-Turpin MA, Jennings MH, Jelesijevic T, Ebenezer P, Aryal A, Yu QZ, Francis J, Dugas TR. Environmental aromatic amine induces pulmonary arterial hypertension associated with estrogen signaling and Serpine1[J]. Journal of Applied Toxicology, 2025, 45(6): 948-963.
- [3] Edeballi Ö, Krupčíková S, Goellner A, Vrana B, Muz M, Melymuk L. Tracking aromatic amines from sources to surface waters[J]. Environmental Science & Technology Letters, 2024, 11(5): 397-409.
- [4] 戴群莹, 彭娟, 董旭东. 多环芳烃对人类健康影响的研究进展[J]. 重庆医学, 2014, 43(21): 2811-2813.
- [5] Pauluhn J, Mohr U. Inhalation toxicity of 4-ethoxyaniline (*p*-phenetidine): critical analysis of results of subacute inhalation exposure studies in rats[J]. Inhalation Toxicology, 2001, 13(11): 993-1013.
- [6] 王孝华. 苯胺废水处理的新进展[J]. 工业水处理, 2010, 30(2): 11-14.
- [7] Wang XH. New progress in the treatment of aniline wastewater[J]. Industrial Water Treatment, 2010, 30(2): 11-14 (in Chinese).
- [7] Zeng X, Huang JH. Anisole-modified hyper-cross-linked resins for efficient adsorption of aniline from aqueous solution[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2020, 569: 177-183.
- [8] 夏爽. 应用超临界水氧化技术处理有机危险废物[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2019.
- [8] Xia S. Application of supercritical water oxidation technology for the treatment of organic hazardous wastes[D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2019 (in Chinese).
- [9] Femina Carolin C, Senthil Kumar P, Chitra B, Fetcia Jackulin C, Ramamurthy R. Stimulation of *Bacillus* sp. by lipopeptide biosurfactant for the degradation of aromatic amine 4-chloroaniline[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 415: 125716.
- [10] Rodrigues AD, dos Santos Montanholi A, Shimabukuro AA, Yonekawa MKA, Cassemiro NS, Silva DB, Marchetti CR, Weirich CE, Beatriz A, Zanoelo FF, Marques MR, Giannesi GC, Das Neves SC, Oliveira RJ, Ruller R, de Lima DP, dos Anjos dos Santos E. *N*-acetylation of toxic aromatic amines by fungi: strain screening, cytotoxicity and genotoxicity evaluation, and application in bioremediation of 3,4-dichloroaniline[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 441: 129887.
- [11] Jiang Y, Shang Y, Zhou J, Yang K, Wang HY. Characterization and biodegradation potential of an aniline-degrading strain of *Pseudomonas* JA1 at low temperature[J]. Desalination and Water Treatment, 2016, 57(52): 25011-25017.
- [12] Luengo JM, Olivera ER. Catabolism of biogenic amines in *Pseudomonas* species[J]. Environmental Microbiology, 2020, 22(4): 1174-1192.
- [13] Varadharajan V, Rajendran R, Muthuramalingam P, Runthala A, Madhesh V, Swaminathan G, Murugan P, Srinivasan H, Park Y, Shin H, Ramesh M. Multi-omics approaches against abiotic and biotic stress-a review[J]. Plants, 2025, 14(6): 865.
- [14] 孟恒立, 胡云, 姜水, 潘轶凡, 张维谊, 刘源. 生物基可降解餐具中 15 种芳香胺迁移研究[J]. 包装工程, 2023, 44(13): 166-174.
- [14] Meng HL, Hu Y, Jiang S, Pan YF, Zhang WY, Liu Y. Migration of 15 primary aromatic amines from biodegradable tableware[J]. Packaging Engineering, 2023, 44(13): 166-174 (in Chinese).
- [15] 李艳鹏, 田越欣, 郝志丹, 马艳玲. 基于转录组分析铜绿假单胞菌 DN1 降解蒽萘特性[J]. 微生物学通报, 2020, 47(1): 54-65.
- [15] Li YP, Tian YX, Hao ZD, Ma YL. Transcriptomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* DN1 upon degradation of fluoranthene[J]. Microbiology China, 2020, 47(1): 54-65 (in Chinese).
- [16] Vihervaara A, Duarte FM, Lis JT. Molecular mechanisms driving transcriptional stress responses[J]. Nature Reviews Genetics, 2018, 19(6): 385-397.
- [17] Wang QN, Wang HD, Jiang YR, Lv M, Wang XY, Chen

- LX. Biotransformation mechanism of *Vibrio diabolicus* to sulfamethoxazole at transcriptional level[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 411: 125023.
- [18] Zhang T, Cai L, Xu BT, Li XC, Qiu WH, Fu CX, Zheng CM. Sulfadiazine biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*: mechanism and degradation product identification[J]. *Chemosphere*, 2019, 237: 124418.
- [19] 陈昌翠, 王乾支, 孙洋洋, 陈静, 闫达中, 邱东茹, 戴景程. 一株玉米赤霉烯酮降解菌的筛选及其降解特性[J]. *微生物学报*, 2025, 65(3): 1266-1282.
- Chen CC, Wang QZ, Sun YY, Chen J, Yan DZ, Qiu DR, Dai JC. Screening and degradation characterization of a zearalenone-degrading strain[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(3): 1266-1282 (in Chinese).
- [20] Wagner GP, Kin K, Lynch VJ. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples[J]. *Theory in Biosciences*, 2012, 131(4): 281-285.
- [21] Hardcastle TJ, Kelly KA. baySeq: empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 422.
- [22] Ringnér M. What is principal component analysis [J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(3): 303-304.
- [23] Palleroni NJ. Introduction to the family *Pseudomonadaceae*[M]//The Prokaryotes. Berlin, Heidelberg: Springer, 1981: 655-665.
- [24] Zhu MJ, Su YH, Wang YR, Bo YL, Sun YF, Liu QY, Zhang H, Zhao CC, Gu YY. Biodegradation characteristics of *p*-chloroaniline and the mechanism of co-metabolism with aniline by *Pseudomonas* sp. CA-1[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 406: 131086.
- [25] Jun W, Liling W, Hepeng Li, Lijiao Y, Chunlei Y. Screening of ammonia nitrogen degradation strains and their degrading characteristics from contaminated water[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2019: 772-776,782.
- [26] Ayarza JM, Mazzella MA, Erijman L. Expression of stress-related proteins in *Sediminibacterium* sp. growing under planktonic conditions[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(9): 1134-1140.
- [27] Du XL, Wang G, Ji J, Shi LP, Guan CF, Jin C. Comparative transcriptome analysis of transcription factors in different maize varieties under salt stress conditions[J]. *Plant Growth Regulation*, 2017, 81(1): 183-195.
- [28] Yin WB, Keller NP. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism[J]. *Journal of Microbiology*, 2011, 49(3): 329-339.
- [29] 刘煜耿, 毛颖津, 章灿川, 高贝乐. *Epsilon*-变形菌趋化信号通路中偶联蛋白CheV与趋化受体蛋白的CZB结构域的功能研究[J]. *热带海洋学报*, 2021, 40(2): 27-38.
- Liu YG, Mao YJ, Zhang CC, Gao BL. Functional study of coupling protein CheV and CZB domain of chemoreceptors in the *epsilon*-proteobacteria chemotaxis signaling pathway[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2021, 40(2): 27-38 (in Chinese).
- [30] 刘慧, 蓝明明, 邢蕾蕾. 鞭毛主调控因子 *flhDC* 调控机制及其在 PGPR 定殖中的功能[J]. *浙江农业科学*, 2023, 64(10): 2575-2582.
- Liu H, Lan MM, Xing LL. Regulation mechanism of flagellar major regulator *flhDC* and its function in PGPR colonization[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2023, 64(10): 2575-2582 (in Chinese).
- [31] Gupta S, Pathak B, Fulekar MH. Molecular approaches for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds: a review[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2015, 14(2): 241-269.
- [32] Qiu XY, Wang WW, Zhang LG, Guo LH, Xu P, Tang HZ. A thermophile *Hydrogenibacillus* sp. strain efficiently degrades environmental pollutants polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Environmental Microbiology*, 2022, 24(1): 436-450.
- [33] Venkatesagowda B, Dekker RFH. Microbial demethylation of lignin: evidence of enzymes participating in the removal of methyl/methoxyl groups[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 147: 109780.
- [34] 刘丽娟, 薛亚平, 郑裕国. 产二甲苯单加氧酶菌株的筛选、鉴定及转化2,5-二甲基吡嗪条件的优化[J]. *化学与生物工程*, 2012, 29(9): 19-25.
- Liu LJ, Xue YP, Zheng YG. Isolation and identification of a xylene monooxygenase-producing strain and optimization of the transformation conditions of 2,5-dimethyl pyrazine[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2012, 29(9): 19-25 (in Chinese).
- [35] Bondaryk M, Grabowska-Jadach I, Ochal Z, Sygitowicz G, Staniszevska M. Possible role of hydrolytic enzymes (Sap, Kex2) in *Candida albicans* response to aromatic compounds bearing a sulfone moiety[J]. *Chemical Papers*, 2016, 70(10): 1336-1350.
- [36] Kunjapur AM, Tarasova Y, Prather KLJ. Synthesis and accumulation of aromatic aldehydes in an engineered strain of *Escherichia coli*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(33): 11644-11654.
- [37] Boll M, Löffler C, Morris BEL, Kung JW. Anaerobic degradation of homocyclic aromatic compounds via arylcarboxyl-coenzyme A esters: organisms, strategies and key enzymes[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(3): 612-627.
- [38] Mirazizi F, Bahrami A, Soleimani Asl S, Zaribafan A, Haghbeen K, Aminzadeh S. Evaluation of oxidative enzymes for efficient oxidation of aniline and phenolic pollutants[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2018, 15(8): 1679-1686.
- [39] Mohlam F, Bakeer W, El-Gebaly E, Amin M. Molecular characterization of aniline biodegradation by some bacterial isolates having unexpressed catechol 2,3-dioxygenase gene[J]. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2018, 12(4): 2027-2039.