



# 硕士学位论文

## *Rhodococcus* sp. LEJB-4 降解邻二甲苯的分子 机制研究

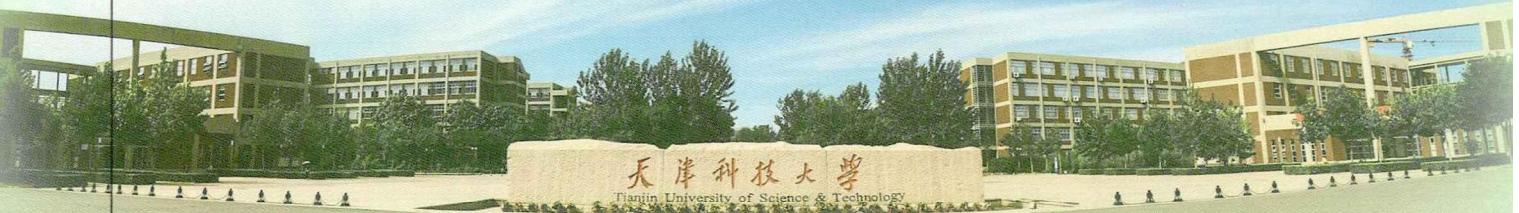
MOLECULAR MECHANISM OF *RHODOCOCCUS* SP.  
LEJB-4 DEGRADING O-XYLENE

学院名称：生物工程学院

专业学位类别（领域）：生物工程

研究生姓名：孙艺哲

指导教师：郁彭教授 黄志勇研究员



2020年6月

# 天津科技大学研究生学位论文

(申请硕士学位)

**Rhodococcus sp. LEJB-4 降解邻二甲苯的分子机制研究**

**MOLECULAR MECHANISM OF RHODOCOCCUS SP. LEJB-4  
DEGRADING O-XYLENE**

专业名称：生物工程

指导教师：郁彭教授 黄志勇研究员

研究生姓名：孙艺哲

申请学位级别：工程硕士

论文提交日期：2020 年 6 月

分类号：Q819

学校代码：10057

密级：公开

研究生学号：17849925

# Rhodococcus sp. LEJB-4 降解邻二甲苯的分子机制研究

## Molecular Mechanism of Rhodococcus sp. LEJB-4 Degrading o-Xylene

专业名称：生物工程

校内指导教师：郁彭教授

校外指导教师：黄志勇研究员

研究生姓名：孙艺哲

申请学位级别：工程硕士

论文提交日期：2020 年 6 月

论文课题来源：省级项目

学位授予单位：天津科技大学

# 天津科技大学

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究工作所取得的成果。除文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包括任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果内容，也不包括为获得天津科技大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。对本文研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

作者签名：孙艺哲

日期：2020 年 6 月 8 日

## 知识产权和专利权保护声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在课题导师具体指导下并得到相关研究经费支持下完成的，其数据和研究成果归属于课题导师和作者本人。知识产权、创造性发明的专利权及使用权参照天津科技大学与中国科学院天津工业生物技术研究所签署的《关于联合培养硕士研究生的协议》及其实施细则执行。本人保证毕业后，以本论文数据和资料发表论文或使用论文工作成果时仍参照《关于联合培养硕士研究生的协议》及其实施细则执行。本人完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

作者签名：孙艺哲

日期：2020 年 6 月 8 日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，同意公布论文的全部或部分内容，允许论文被查阅和借阅。本人授权天津科技大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保 密  (请在方框内打“√”)，在 年解密后适用本授权书。

本学位论文属于

不保密  (请在方框内打“√”)。

作者签名：孙艺哲

日期：2020 年 6 月 8 日

导师签名：

黄立勇

日期：2020 年 6 月 8 日

## 摘要

邻二甲苯是一种工业中常见的挥发性有机污染物，它具有不溶于水、难降解等特点，当其排放至环境中会对环境造成严重污染。目前，生物法越来越多的应用于挥发性有机气体的降解，具有投入低，操作简单，无二次污染等优势。但是当前对微生物降解邻二甲苯机制研究的报道较少。因此，本课题从二甲苯生物滴滤降解反应器的生物膜上筛选到一株高效的邻二甲苯降解菌，对其降解邻二甲苯的生理特性进行了研究，利用转录组测序技术对菌株代谢邻二甲苯的分子机制进行研究，并对胞内邻二甲苯代谢相关的生化反应和其它途径进行分析，主要成果结论如下：

(1) 通过“LB 培养基富集、无机盐培养基初筛、无机盐平板复筛”的方法，快速筛选出 7 株邻二甲苯降解菌。其中菌株 LEJB-4 的降解效率最高，其菌落形态呈不规则形，表面干燥粗糙，细胞形态呈杆状。 $16\text{s rDNA}$  测序比对后，显示菌株 LEJB-4 为红球菌属，因此将其命名为 *Rhodococcus* sp. LEJB-4。

(2) 温度、 $\text{pH}$  等要素影响细菌体内所进行的多个生化反应。研究发现，菌株 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 最适生长温度为  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，最适初始  $\text{pH}$  为 7.0，其不仅可以邻二甲苯为唯一碳源进行生长，同时也可以苯、甲苯作为唯一碳源。在最适生长条件下，菌株 LEJB-4 在 32 h 内对初始浓度为  $440\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的邻二甲苯的降解效率达到 99 %。

(3) 通过转录组测序的方法，构建菌株 LEJB-4 代谢邻二甲苯的基因时间表达图谱。经组装后获得 6880 个 Unigene。通过对 Unigene 进行注释，其中有 2622 个基因被注释至 KEGG 数据库的 231 条代谢途径中。经过分析得到了邻二甲苯的代谢途径：邻二甲苯在双加氧酶的催化作用下生成邻二甲苯顺式二氢二醇，随后邻二甲苯顺式二氢二醇脱氢形成二甲基邻苯二酚，再经过双加氧酶的作用下开环生成 2-羟基-5-甲基-6 氧代-庚-2,4-二烯酸脂，最后进入三羧酸途径生成  $\text{CO}_2$ 。

(4) 菌株 LEJB-4 的邻二甲苯代谢途径在降解邻二甲苯的同时，细胞壁和细胞膜的合成以及三羧酸循环途径相关蛋白基因表达水平显著变化，说明这些途径在菌株 LEJB-4 代谢邻二甲苯过程中发挥了重要的作用。

本工作对全局水平解析生物降解邻二甲苯的分子机制奠定了基础。

**关键词：** 邻二甲苯；生物法；转录组学；分子代谢机制

## ABSTRACT

O-xylene is a common volatile organic pollutant in the industry. It is insoluble in water and difficult to degrade. When it is released into the environment, it will cause serious pollution to the environment. Biological methods are increasingly applied to the degradation of volatile organic compounds, which have the advantages of low cost, small footprint, simple operation and no secondary pollution. However, there are few reports on the mechanism of microbial degradation of o-xylene. Therefore, this topic screened the o-xylene-degrading bacteria and studied the growth characteristics. The molecular mechanism of bacterial degradation of o-xylene by transcriptomics, research and analysis of biochemical reactions and other pathways related to intracellular xylene metabolism, the main results are as follows:

(1) Through the method of "enrichment of LB medium, preliminary screening of mineral salt medium, and secondary screening of mineral salt plate", 7 strains of o-xylene degrading bacteria were quickly selected. Among them, the strain LEJB-4 has the highest degradation efficiency, the colony morphology is irregular, the surface is dry and rough, and the cell morphology is rod-shaped. After 16s rDNA sequencing and comparison, the strain LEJB-4 was shown to be *Rhodococcus*, so it was named *Rhodococcus* sp. LEJB-4.

(2) Factors such as temperature and pH affect various biochemical reactions in the microorganism. The research found that the optimal growth temperature of the strain *Rhodococcus* sp. LEJB-4 is 30 °C and the optimal pH is 7. It can not only grow with o-xylene as the sole carbon source, but also use benzene and toluene as the sole carbon source. Under the optimal growth conditions, the strain LEJB-4 had a degradation efficiency of 99 % in 32 h to o-xylene.

(3) Transcriptome sequencing was used to sequence the bacterial cells of the strain LEJB-4 at different time points in the o-xylene medium, and 6880 Unigenes were obtained after assembly. By annotating Unigene, 2622 genes were annotated into the 231 metabolic pathways of the KEGG database. After analysis, the metabolic pathway of o-xylene was obtained: o-xylene forms o-xylene cis-dihydrodiol under the action of dioxygenase, and then o-xylene cis-dihydrodiol is dehydrogenated to form dimethylcatechol. Under the action of ring opening, 2-hydroxy-5-methyl-6-oxo-hepta-2,4-dienoate is formed, and finally enters the tricarboxylic acid cycle to generate CO<sub>2</sub>.

(4) While the o-xylene metabolism pathway of strain LEJB-4 degrades o-xylene, the expression levels of cell wall, cell membrane and tricarboxylic acid cycle pathway-related protein genes change significantly, it is shown that o-xylene metabolism has obvious regulation effect on cell wall, cell membrane-related protein genes and tricarboxylic acid cycle pathway.

The above work provides a theoretical basis for the application of o-xylene degrading bacteria in the field of industrial degradation of o-xylene waste gas.

**Key words:** o-xylene, biological method, transcriptomics, molecular metabolic mechanism

# 目 录

<b>1 前 言 .....</b>	<b>1</b>
1.1 VOCs 概述 .....	1
1.1.1 VOCs 的定义及分类 .....	1
1.1.2 VOCs 的来源、特点及其危害 .....	1
1.1.3 我国 VOCs 的污染现状 .....	2
1.2 VOCs 污染的处理技术 .....	2
1.3 邻二甲苯的生物降解 .....	4
1.3.1 邻二甲苯的结构及性质 .....	4
1.3.2 邻二甲苯降解菌 .....	4
1.3.3 细菌对邻二甲苯的降解途径 .....	5
1.4 转录组学研究 .....	6
1.4.1 转录组学研究历程 .....	7
1.4.2 高通量测序在转录组学中的应用 .....	10
1.5 国内外研究动态 .....	10
1.6 研究的目的及意义 .....	11
1.7 本课题研究内容及技术路线 .....	12
1.7.1 主要研究内容 .....	12
1.7.2 技术路线 .....	12
<b>2 材料与方法 .....</b>	<b>14</b>
2.1 实验材料 .....	14
2.1.1 药品试剂 .....	14
2.1.2 实验仪器 .....	15
2.1.3 主要培养基及缓冲液 .....	15
2.2 实验方法 .....	16
2.2.1 邻二甲苯降解菌的筛选鉴定 .....	16
2.2.2 菌株最适生长条件的研究 .....	18
2.2.3 邻二甲苯的测定 .....	19
2.2.4 菌株的生长曲线与邻二甲苯的降解曲线的绘制 .....	21
2.2.5 转录组取样点的确定及样品的收集 .....	21
2.2.6 样品总 RNA 的提取及纯化 .....	21
2.2.7 cDNA 文库的构建、转录组测序和数据分析 .....	22
<b>3 结果与讨论 .....</b>	<b>23</b>
3.1 邻二甲苯降解菌筛选和鉴定 .....	23
3.1.1 邻二甲苯降解菌的筛选 .....	23

3.1.2 邻二甲苯降解菌鉴定.....	23
3.1.3 细胞形态检测.....	26
3.2 菌株生长特性研究 .....	28
3.2.1 最适温度.....	28
3.2.2 最适 pH.....	29
3.2.3 底物的广谱性.....	30
3.3 菌株 LEJB-4 降解邻二甲苯的特性研究.....	31
3.4 总 RNA 纯度和完整性检测.....	32
3.5 COG 注释 .....	33
3.6 GO 注释.....	34
3.7 KEGG 注释 .....	35
3.8 差异表达基因分析 .....	35
3.9 <i>Rhodococcus</i> sp. LEJB-4 代谢邻二甲苯过程的差异表达基因分析 .....	38
3.10 <i>Rhodococcus</i> sp. LEJB-4 TCA 途径的差异表达基因分析 .....	45
3.11 <i>Rhodococcus</i> sp. LEJB-4 细胞壁和细胞膜相关蛋白基因 .....	47
<b>4 结 论.....</b>	<b>50</b>
4.1 全文总结 .....	50
4.2 论文的创新点 .....	50
4.3 论文的不足之处 .....	50
<b>5 展 望.....</b>	<b>52</b>
<b>6 参考文献.....</b>	<b>53</b>
<b>7 攻读硕士学位期间发表论文情况.....</b>	<b>59</b>
<b>8 致 谢 .....</b>	<b>60</b>
<b>9 附 录 .....</b>	<b>61</b>

## 1 前 言

### 1.1 VOCs 概述

#### 1.1.1 VOCs 的定义及分类

全球不同的组织对于挥发性有机化合物(Volatile Organic Compounds, 简称 VOCs)具有的不同的定义。世界卫生组织(WHO)对挥发性有机化合物定义为:在常温下,沸点在 50 °C 至 260 °C 之间的各种有机化合物<sup>[1]</sup>。而 VOCs 还有另外一种来自美国联合环境保护组织(EPA)的定义,即除了一氧化碳、二氧化碳、碳酸、碳酸铵、金属碳酸盐和金属碳化物之外,所有参与大气中光化学反应的碳化合物<sup>[2-4]</sup>。综合上述两种定义,表明 VOCs 的挥发性及其参与光化学反应的特性在环境治理过程中有重要意义。

VOCs 的种类繁多,根据官能团的不同,可分为苯系物(苯、甲基苯、乙基苯、二甲苯等)、卤代烃(二氯乙烷、三氯乙烷等)、醇类(甲醇、乙醇等)、醛类(甲醛、乙醛等)、醚类(乙醚、丁醚等)、酮类(丙酮、丁酮等)、酚类(苯酚)、酸类(乙酸、丙烯酸)、酯类(乙酸乙酯、乙酸丙酯)、胺类(二甲胺、三乙胺等)、烷烃(丙烷、环己烷等)和烯烃(乙烯、苯乙烯等)<sup>[5,6]</sup>。

#### 1.1.2 VOCs 的来源、特点及其危害

VOCs 的来源主要包括天然来源和人为来源<sup>[7]</sup>。天然来源主要是指自然界中植物释放、火山喷发和森林火灾等排放源,其中森林和灌木丛所释放的异戊二烯和单萜烯是最主要的污染源<sup>[8]</sup>。人为来源主要包括石油与煤炭的炼制与燃烧、涂料、胶类黏合剂、包装印刷、交通运输等使用或排放污染物质的工业源,还有建筑装饰、餐饮油烟等居民日常生活源<sup>[9]</sup>。虽然认为自然源是 VOCs 产生的主要来源,但是近年来随着全球工业的发展,人为源的贡献比例在逐年增加。其中交通运输是全球最大的人为排放来源,溶剂使用次之。

VOCs 含有来源广、易挥发、毒性大、难降解、排放量大等特征<sup>[10]</sup>。据有关统计,VOC 排放量占总污染排放量的 50 %,根据《大气挥发性有机物源排放清单编制技术指南》2014 年 VOC 排放量为 1700 万吨,预测 2020 年排放量超过 2000 万吨。这些 VOCs 污染物既包括亲水性也包括疏水性。亲水性污染物(包括醇类、醛类等)易溶于水,易被生物高效降解利用。疏水性污染物(包括苯、二甲苯等)的水溶性较差,降低了传质效率。但是研究结果表明:一些疏水性污染物也具有较好的生物可降解性。因此,生物法也是处理 VOCs 的方法之一。

工业源 VOCs 除上述特性外,一般还具有较强的刺激性和毒害性,对人体健康产生严重影响,甚至具有致畸、致癌、致突变作用<sup>[11,12]</sup>。同时 VOCs 的化学活性强,参与大气光化学反应,在阳光下产生光化学烟雾,导致人的眼睛和呼吸道系统受到损伤,甚至会有生命危险。同时, VOCs 是产生 PM2.5 的原因之一,空气中 PM2.5 的超标导致了雾霾现象的产生<sup>[13]</sup>。最近,我国多个地区在冬季的雾霾天气日益严重,对人的健

康构成巨大威胁。卤代烃类 VOCs 还会对臭氧层产生影响，引起温室效应等一系列全球性的生态环境问题<sup>[14]</sup>。因此，VOCs 的排放对人类生存、生态环境等都有巨大的影响。

### 1.1.3 我国 VOCs 的污染现状

相比于一些发达国家 VOCs 治理始于 20 世纪 90 年代，我国对于 VOCs 的减排与控制及法规的颁布相对滞后，我国于 2010 年 5 月颁布了《环境保护部门关于推进大气污染联防联控工作改善区域空气质量指导意见的通知》，这是我国首次从国家的层次上提出 VOCs 的防治工作<sup>[11]</sup>。直到 2012 年在《重点区域大气污染防治“十二五”规划》中才对控制 VOCs 的排放提出确切要求。随着我国近年来工业的飞速发展，VOCs 的排放及污染程度呈上升趋势，其占到污染排放总量的 50 %。

根据相关研究发现，目前我国 VOCs 的主要来源包括机动车尾气排放和工业排放等。这些 VOCs 的排放具有以下两种特征：一种是大气中 VOCs 的分布随时间变化而改变，不同的时间具有不同的特征；另一种是不同地区间的差异较大。以京津冀、珠三角和长三角等地区为研究对象发现，发现工业城市大气中 VOCs 的浓度高于非工业城市；城市空气中 VOCs 的浓度明显大于农村地区；北方燃煤的地区在冬季大气中 VOCs 的浓度高于南方非供暖地区<sup>[15]</sup>。与此同时，我国机动车保有量仍然逐步增加。所以综合来看，现在我国的 VOCs 污染现状比较严峻，VOCs 的治理已成为控制环境污染的重要部分。

## 1.2 VOCs 污染的处理技术

目前，对于 VOCs 有多种治理的技术，其中常见的包括吸附法、吸收法、热破坏法、光催化氧化法、冷凝法、膜分离法、低温等离子法和生物法等<sup>[16-18]</sup>。

### （1）吸附法

吸附法处理 VOCs 的本质是利用比表面积较大的吸附剂将 VOCs 分子吸附<sup>[19]</sup>。即当 VOCs 气体与多孔的吸附剂接触时，通过吸附剂表面的分子间作用力，使混合气体中 VOCs 成分被吸附在吸附剂表面。不同的吸附剂决定了 VOCs 的吸附处理效果，活性炭、沸石、膨润土、硅胶和活性氧化铝等都是常见的吸附剂。

吸附法在工业中的应用较为广泛，具有成本低、工艺简单、去除效率高、净化完全、易于推广等优点，具有良好的环保功能和经济效益<sup>[20]</sup>。缺点是主要用于低浓度、大风量的 VOCs 处理、易于产生二次污染，因此此方法多与其它方法联合使用。

### （2）吸收法

吸收法是将低挥发或非挥发的物质作为吸收剂，通过将吸收剂和气体相接触，将气体中 VOCs 进行吸收，从而起到去除作用的一种方法<sup>[21]</sup>。吸收剂是决定去除效果的关键因素，常见的吸收剂包括液态石油类物质与表面活性剂的水溶液等。

吸收法多处理气量大、浓度高、温度低等特点的有机气体。此方法处理 VOCs 废气，易操作，原料价廉易得，适用范围广泛。但是其需要严格要求吸收设备及工况，且需要将吸收剂进行回收，易产生二次污染<sup>[17]</sup>。

### (3) 热破坏法

热破坏法是对 VOCs 进行燃烧和辅助燃烧，或通过催化剂加速 VOCs 的分解，从而减小有机废气浓度的一类方法。此方法多用于化工、喷漆、绝缘材料等行业。根据燃烧的工艺差别，热破坏法又分为直接燃烧法、热力燃烧法和催化燃烧法。

直接燃烧法具有投资费用低、操作简单、适用于高浓度废气等优点，但需要较完善的安全措施。催化燃烧法需要使用合适的催化剂，与另外两种方法相比，催化燃烧法所需的设备体积小，去除效率高，且产生的二次污染物较少，但是催化剂价格昂贵，成本高，并且在处理 VOCs 时会可能会出现催化剂中毒的现象<sup>[22]</sup>。

### (4) 光催化氧化

光催化氧化法是一种光氧化反应，需要在催化剂的催化作用下进行。通过利用光（紫外）照射某些半导体光催化剂（如 TiO<sub>2</sub>、WO<sub>3</sub> 等），使有机气体完全降解为 CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O 和无机水分子物质<sup>[23]</sup>。光催化氧化剂在此过程中发挥重要作用，不仅对化学反应具有加速作用，同时还具有杀菌和消毒的作用。

光催化氧化技术对废气具有较强的处理能力，目前应用比较广泛，其适用于处理有机废气浓度较低，气量较小的工况，同时具有运行成本低，反应速度快，耗时短，无二次污染等优点。但目前对于高浓度 VOCs 的处理效果不佳，实际应用较少<sup>[24]</sup>。

### (5) 冷凝法

冷凝法主要是利用有机物质的物理性质来实现的，由于饱和蒸汽压随温度的变化而变化，因此可以通过改变温度或压力的方式，使有机污染物从蒸汽状态中被分离出来。

冷凝法适用于沸点较高和浓度大（大于 25g•m<sup>-3</sup>）的 VOCs 污染气体的回收，此方法的优点为流程简单，回收率高且设备占地面积小。但是当单独使用此方法时，对于温度的要求较为严格，因此具有一定的难度。因此该法多用作一级处理方法，并与其他处理方法共同使用。

### (6) 膜分离法

膜分离法是采用对有机物具有选择透过性的高分子膜，在一定的压力驱使下，使不同分子大小的 VOCs 渗透而达到分离的目的<sup>[25]</sup>。膜材料和膜技术是此方法关键。

利用膜分离法处理 VOCs，其优点包括流程简单、设备占地面积小、回收率高、无二次污染等。但膜材质价格高，大多数膜工艺运行费用昂贵。

### (7) 低温等离子法

低温等离子法是近年来才发展起来的废气治理技术，其原理是通过气体在高压电场中放电以产生高能电子，对废气中的气体分子反复轰击，从而使气体中的分子电离、激活或裂解，复杂的大分子物质转变为二氧化碳和水等小分子物质<sup>[26]</sup>。

目前，低温等离子法具有操作简便、能耗低、运行环境要求较低和使用寿命较长等优点。它对芳烃的处理效率较高，但是对于浓度较高和成分复杂的 VOCs 处理效果一般且此技术的实际应用还处于实验探索阶段，尚未大范围实现工业化应用<sup>[24]</sup>。

### (8) 生物法

生物法的本质为：利用微生物的生理生化反应将来自废气中的有毒有害的物质作为碳源和能源，将其降解为小分子的无机物，例如 CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O 和其他的小分子物质等 [27, 28]。

生物处理法一般包括三个步骤。第一步，废气中的有机污染物必须先通入水中，使其溶解；随后，溶解在水中的污染物通过浓度差作用扩散至微生物膜中，使微生物可以将其吸收；最后，有机物作为碳源或能源被微生物通过生化反应过程被降解，最终降解为环境友好的物质。

生物法与传统的方法相比，具有投资成本低、运维费用低、操作简单、应用广泛等优点，对于可生物降解的物质有较高的降解效率<sup>[29, 30]</sup>。

## 1.3 邻二甲苯的生物降解

### 1.3.1 邻二甲苯的结构及性质

苯系物是 VOCs 污染物的重要组成部分，属于一种具有挥发性的单环芳香烃类有机物，它包括苯、甲苯、乙苯、二甲苯这四种物质，故简称苯系物为 BTEX<sup>[31]</sup>。在苯系物中，二甲苯(Xylene)是通过两个甲基替代苯环上两个氢所形成的产物，具有“邻、间、对”三种同分异构体，分别为邻二甲苯，间二甲苯和对二甲苯。其中邻二甲苯(Ortho-Xylene) 分子量 106.16，无色透明液体，相对密度 0.879 g·mL<sup>-1</sup> (20 °C)，熔点 -25.5 °C，沸点 144.4 °C。难溶于水，但能溶于乙醇、二硫化碳、乙酸乙酯等多种有机溶剂。在 3 种二甲苯的同分异构体中，邻二甲苯的生物可降解性最差，且刺激性气味较另外两种同分异构体小<sup>[32]</sup>。

苯系物中的四种物质对大气中苯系物总量的具有不同的贡献率，其中二甲苯对总量的贡献率是最高的。二甲苯废气是广泛存在于环境中的一种非常典型的 VOCs，由原油经石油化工过程制得，其主要来源包括印刷、喷漆、涂料、石油加工等有机化工领域。二甲苯具有易挥发的特点，因此其在生产，储存，运输和使用过程易挥发至大气环境中，从而对区域环境空气质量产生严重影响。同时，高浓度的邻二甲苯也会对人体产生危害。邻二甲苯会刺激人和动物的感觉器官和上呼吸道并产生不同程度的毒性影响。在其浓度较大时，甚至会对中枢神经系统产生麻痹的作用，瞬间吸入高浓度的邻二甲苯会导致窒息现象产生<sup>[33]</sup>。综上，采用适合的方法降解邻二甲苯是非常必要的。所以，本论文选取邻二甲苯作为研究对象，进行邻二甲苯降解菌的筛选及菌株代谢分子机制的研究。

### 1.3.2 邻二甲苯降解菌

邻二甲苯的降解方式包括挥发、化学氧化、光催化、和微生物降解等方法。在这些方法中，微生物法是降解邻二甲苯的主要方法，相比于其它方法，它具有投资少，占地少，操作简单，环境友好且无二次污染等优点。在邻二甲苯降解过程中，微生物可以直接将邻二甲苯降解为 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O，或者将其分解为结构简单的、溶于水的、易

分解的化合物，如二甲基邻苯二酚等，使其对环境的危害程度降到最低。

在微生物降解邻二甲苯的研究中，筛选获取邻二甲苯降解菌是其中一个重要内容。在天然环境中，存在具有降解邻二甲苯的能力微生物，目前已经从不同污染环境体系中分离得到了一些具有高效降解邻二甲苯能力的微生物，包含细菌、真菌等，其中大部分微生物属于细菌类，目前已报道的菌属包括红球菌属 (*Rhodococcus*)<sup>[34-37]</sup>、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)<sup>[38, 39]</sup>、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)<sup>[40]</sup>、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)<sup>[41]</sup>、动胶菌属 (*Zoogloea*)<sup>[42]</sup>和鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)<sup>[43]</sup>等。

### 1.3.3 细菌对邻二甲苯的降解途径

邻二甲苯的代谢过程的研究，既是掌握细菌对邻二甲苯的代谢机制及其中间产物对环境影响的基础，也是环境修复应用的理论前提。虽然目前在有氧条件下能够降解间二甲苯或对二甲苯的细菌及其相应的分解代谢途径已经有了较多文献报道，但是能够降解邻二甲苯的细菌并不常见，它们的代谢途径研究也还处于初级阶段。

细菌代谢邻二甲苯的代谢途径主要有两种，分别为单加氧途径和双加氧途径，这两个代谢途径的名称是根据邻二甲苯降解过程中的首个关键酶而命名的。通过研究表明，这两种代谢途径都是首先通过加氧酶，在苯环或与苯环相连的甲基上进行加氧，随后使苯环进行开环裂解，最后进入三羧酸途径完全降解。但是，这两种代谢途径的具体反应机制是具有差异的。

在单加氧途径中，邻二甲苯首先在甲苯甲基单加氧酶的催化作用下形成 2-甲基苯甲醇<sup>[44]</sup>，随后在脱氢酶的作用下形成 2-甲基苯甲醛，之后再形成 2-甲基苯甲酸，随后 2-甲基苯甲酸在双加氧酶的作用下进行开环，生成顺式-2-羟基-6-氧代-庚-2,4-二烯酸脂<sup>[45]</sup>，最终经过 TCA 途径，完全降解为 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O。研究表明，红球菌属 (*Rhodococcus*) 可以通过单加氧途径实现邻二甲苯的降解<sup>[34]</sup>（图 1-1）。

在双加氧途径中，邻二甲苯在首先双加氧酶的催化作用下生成邻二甲苯顺式-3,4-二氢二醇，随后邻二甲苯顺式-3,4-二氢二醇在脱氢酶的作用下形成 3,4-二甲基邻苯二酚，之后进入邻苯二酚代谢途径，在双加氧酶的作用下氧化开环生成 2-羟基-5-甲基-6-氧代-庚-2,4-二烯酸脂，最终进入 TCA 循环途径生成二氧化碳和水<sup>[46]</sup>。研究发现，采用双加氧途径降解邻二甲苯的细菌多见于红球菌属 (*Rhodococcus*)、动胶菌属 (*Zoogloea*)<sup>[42]</sup>等（图 1-1）。

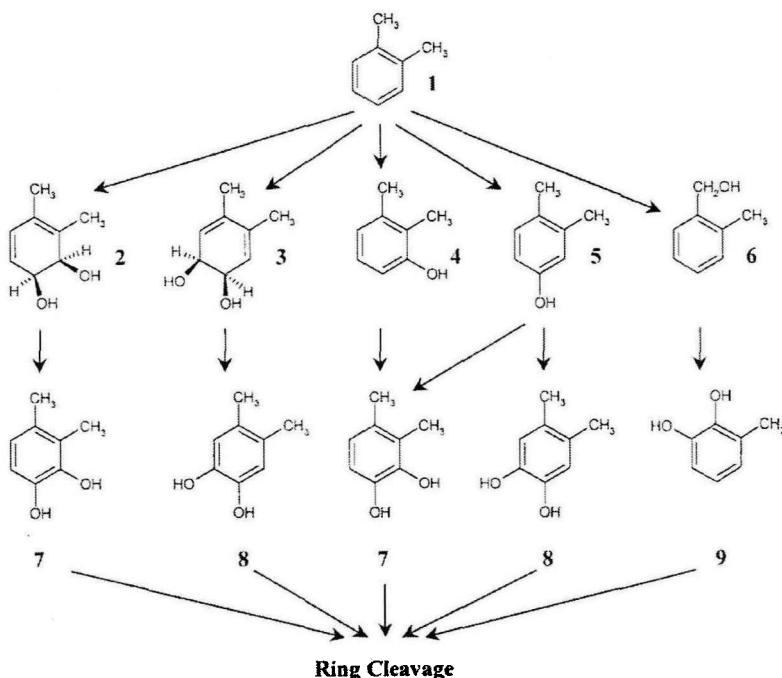
图 1-1 细菌中邻二甲苯不同的代谢途径<sup>[37]</sup>

Fig. 1-1 Overview of different o-xylene degradation pathways in bacteria

除此之外,有学者在研究邻二甲苯降解菌 *Rhodococcus opacus* R7 的代谢机制时发现,菌株 R7 细胞内同时含有多条邻二甲苯的代谢途径,包含了单加氧途径和双加氧途径,其中 3,4-二甲基邻苯二酚是菌株 R7 的重要代谢产物。因此,对于邻二甲苯降解菌而言,一株菌同时可能含有单加氧途径和双加氧途径<sup>[47]</sup>。

#### 1.4 转录组学研究

21 世纪以来,基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学等各类组学研究技术在细胞研究中开始广泛应用,功能基因组学与生物学研究已经密切联系。基因组学 (Genomics)、转录组学 (Transcriptomics)、蛋白质组学 (Proteomics) 和代谢组学 (Metabolomics) 共同组成了功能基因组学 (Functional Genomics), 它可以通过基因组学提供相关信息,与其它组学分析结果相结合,探究它们之间的相互联系和影响,使研究者能够了解更全面的信息<sup>[48]</sup>。

转录组的定义为细胞内所有 RNA 转录本的总和,其由 mRNA 和各种非编码 RNA (小 RNA、核糖体 RNA 和转运 RNA 等) 组成<sup>[49]</sup>。RNA 在 DNA 编码的信息与细胞表型之间起到连接作用。生物体表型所表现出来的与细胞内基因表达水平变化是息息相关的,即基因表达水平的变化决定着细胞及生物体的变化。与基因组不同,转录组学具有动态性和针对性,它对不同状态或不同时态下的细胞或组织中特定生命活动过程的相关基因表达动态变化及规律进行研究。转录组学是被包含在功能基因组学中一个新的分支,它可以对细胞内基因转录水平变化及规律进行精确、全方位的阐述<sup>[48]</sup>,

而且能够注释包括非编码的小 RNA 在内的所有种类的 RNA。由于具有能够确定基因的剪接模式以及对差异表达基因进行定量等优势，所以转录组学在多个领域被广泛应用，其中包括医药<sup>[50]</sup>、动物<sup>[51]</sup>、植物<sup>[52]</sup>和微生物<sup>[53]</sup>等领域。目前，对特定生物体内反应过程和机体的生长发育、体内调节、应激功能和免疫系统等分子机理的研究具有重大意义。

### 1.4.1 转录组学研究历程

随着分子杂交技术的创新发展以及各种基于标签序列的分析方法的应用，转录组学快速发展。多种转录组技术平台迅速发展和应用，使得可实现对大批量基因的转录情况进行同时分析，节约时间与成本，提高测序效率。测序技术主要包括：基因芯片技术(Microarray)、基因表达系列分析技术(Serialanalysis of gene expression, SAGE)、大规模平行测序技术 (Massively parallel signature sequencing, MPSS) 以及近年来发展起来的 RNA 测序技术 (RNA sequencing, RNA-seq)<sup>[54]</sup>，上述技术的主要工作流程如图 1-2 所示<sup>[55]</sup>。

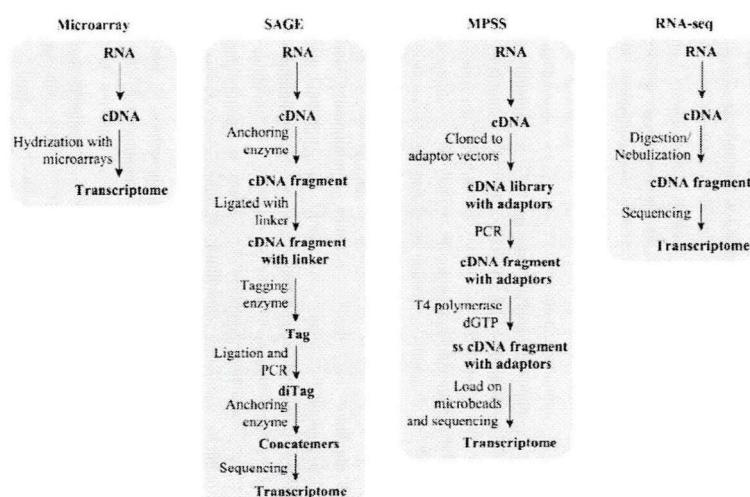


图 1-2 主要转录组技术平台工作流程示意图

Fig. 1-2 Outline protocols of the main transcriptome platforms

目前几种高通量基因表达分析技术具有各自的特点，适用于不同特点的样品，这些技术虽然在某些方面的特性具有相似性，但也可以混合使用，数据互补后获得更加全面的数据。几种技术的优缺点如所示<sup>[55]</sup>。

表 1-1 不同高通量基因表达分析方法的比较

Table 1-1 Comparison of methods used in global analysis of gene expression of organism

	优点	缺点
Hybridization-based (Microarray)	样品易制备； 成本低、快速、特异性高； 成熟的信息学和统计学方法；	受基因发现和预测程序的限制； 比较不同平台的数据和获得组织中 mRNA 表达的绝对数量比

		较困难; 检测微小差异表达转录本的重 复性差;
Tag-based (SAGE and MPSS)	可定量; 可识别新型序列; 灵敏度和序列无关;	样本偏差; 短标签导致序列不清晰; 需要综合参考数据库; 成本高且样品制备复杂;
RNA-sequencing (RNA-seq)	可定量; 可识别新型序列; 灵敏度和序列无关; 避免克隆的需要; 可匹配 RNA 拼接; 标签长, 注释精确。	成本高且样品制备复杂; 生物信息学工具有限。

#### 1.4.1.1 第一代测序技术

在分子机制的研究中, DNA 测序是重要技术, 它的发展历程包括几个重要阶段。二十世纪 90 年代, 第一代转录技术开始发展, 包括基因芯片、SAGE 和 MPSS。基因芯片技术是一种跨学科的高新技术。它是将大量的具有设定好的排列方式的探针固定在载体上, 然后通过碱基互补配对原则使样品中的 DNA 与载体上所固定的探针相互结合, 从而获得样品的基因表达信息<sup>[56]</sup>。

SAGE 和 MPSS 技术的发展是从基于 Sanger 的测序技术之上的。SAGE 技术可快速获取到转录图谱并发现新的基因及其相关功能。它首先通过锚定酶对 RNA 反转录合成的 cDNA 进行酶切, 使其分成多个部分。随后 cDNA 片段与相应的接头进行连接, 后利用标签酶酶切基因片段以释放标签序列。通过连接酶的功能形成两个不同的含标签的连接头并对其进行测序。SAGE 技术较基因芯片方法相比具有较高的精确度和重复性。MPSS 技术是在 SAGE 的基础上改良形成的测序技术, 相比之下它具有运行时间短等优点。

#### 1.4.1.2 第二代测序技术

近些年来, 生命科学保持高速发展, 出现了一系列新型实验方法与技术, 与之相关的实验仪器和操作技术也层出不穷。在 DNA 测序方面, 高通量测序技术逐步替代了第一代测序技术, 这对转录组技术的应用具有重要意义。这种利用新一代测序技术测定 cDNA 文库序列的方法被命名为 RNA-Seq 技术, 又被命名为第二代测序技术。第二代测序技术的应用范围目前逐渐扩展至基因表达分析领域。该技术已经成为转录组学研究的强有力工具, 其功能包括全方位的研究转录本, 对基因表达进行精确定量等<sup>[57]</sup>。

目前有三个 RNA 测序平台应用最广泛, 分别是 Roche (454) GS FLX sequencer、Illumina genome analyzer 和 Applied Biosystems SOLID sequencer。虽然三个 RNA 测序

平台基本原理都相似，并且其中心原则均为边合成边测序（sequencing by synthesis，SBS），但是其具体原理有所不同，如表 1-2 所示<sup>[58]</sup>。Roche454FLX 测序又被称为焦磷酸测序，其基本原理是以焦磷酸作为底物进行测序。Roche454 测序技术具有耗时短、高效、成本低等优势。碱基读取效率高，但其成本约为 Sanger 方法的 10%<sup>[59]</sup>。Illumina 测序的原理为大规模平行的 SBS。Illumina 测序技术兼具运行成本低和高性价比等优点，但是该系统速率慢，在实验运行过程中时间长，测序片段短<sup>[60]</sup>。SOLID 技术的原理为“双碱基编码原理”，包括 em PCR 和磁珠阵列微反应器，将模板进行修饰并保证扩增出的模板存在于玻璃载片上，随后使用被荧光标记的寡核苷酸开始连续接合反应，以进行测序<sup>[61]</sup>。SOLID 技术具有精确度高（测序数据的准确率大于 99.94%）通量大和系统灵活等优点，但是测序读长较短。

表 1-2 不同二代测序平台的比较

Table 1-2 Comparison of different next-generation sequencing platforms

测序平台	Roche/454	Illumina/Solexa	ABI/Solid
原理	焦磷酸合成测序	可逆性链终止合成测序	双碱基编码连接测序
平均读长/bp	100 ~ 400	35 ~ 150	35 ~ 50
数据量/(Gb·run <sup>-1</sup> )	0.1 ~ 1	1 ~ 10	1 ~ 10
需要时间/(days·run <sup>-1</sup> )	0.33	3 ~ 5	5 ~ 8
成本/(USD·b <sup>-1</sup> )	0.09	0.003	0.005

### 1.4.1.3 第三代测序技术

Pac Bio 测序技术是近期新兴的一种单分子实时测序技术，属于第三代测序技术，又叫做全长转录组测序。第二代测序技术不能实现对单一的 RNA 分子进行全测序，使测序后的分析工作存在困难。而以 Pac Bio 转录组测序由于能够对长度显著的全长转录或片段进行测序，有利于基因亚型的鉴定，有助于可靠地发现新的基因和注释基因的新亚型（图 1-3）。这种方法使得单碱基测序的精确度大大提高。但现在仍然存在问题，例如技术不够完善、单分子的荧光信号较弱等等。第三代测序技术逐渐成为科研人员的研究热点，使其逐渐优化和发展。

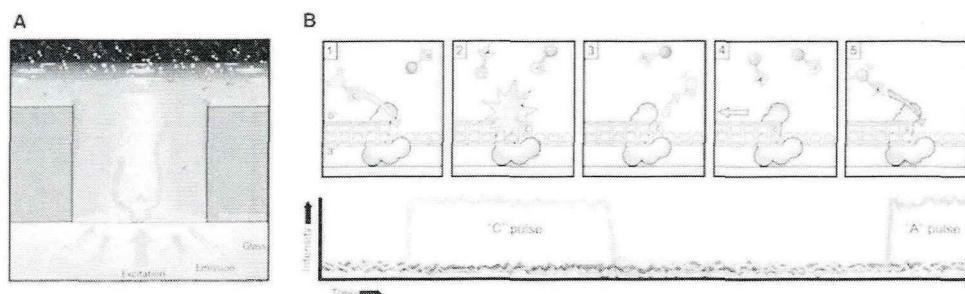


图 1-3 Pac Bio 测序原理<sup>[62]</sup>

Fig. 1-3 Principle of Pac Bio

### 1.4.2 高通量测序在转录组学中的应用

2008 年, Nagalakshmi<sup>[63]</sup>等利用 RNA-Seq 测序技术对酿酒酵母进行分析; Wilhel<sup>[64]</sup>等利用 RNA-Seq 测序技术对裂殖酵母进行研究; 随后 Tripathy<sup>[65]</sup>等利用该技术研究了低温对短杆菌转录组的影响; Ting Zhou<sup>[66]</sup>等利用该技术对红豆杉合成紫杉醇的相关基因进行研究。该技术在动物、植物和微生物等领域已广泛应用, 说明 RNA-Seq 技术逐渐成熟, 并且在转录组学的相关研究中发挥重要作用。

## 1.5 国内外研究动态

生物法治理 VOCs 气体在工业中实现应用最早是源自美国, 其向 40~60 cm 深度的土壤里导入恶臭气体, 以减小恶臭气体浓度。1959 年, 在联邦德国的一个污水处理厂建立了一个填充土壤的生物过滤床, 用于控制污水输送管散发的臭味<sup>[67]</sup>。近年来, 在美国、英国、德国和日本等发达国家对于生物法处理有机气体已经大面积使用, 包括完善的生物滤池和生物滴滤法。仅在德国、荷兰和美国就有多达 500 套生物滤池处理装置<sup>[68]</sup>。虽然生物法在工业中广泛应用, 但是此领域的研究多为工业设备和条件的优化, 关于微生物降解 VOCs 废气的分子机制研究报道较少。

由于邻二甲苯是一种难降解的 VOCs 污染物, 因此对生物法降解邻二甲苯及微生物降解邻二甲苯代谢途径的研究是很有必要的。1984 年, Gibson 和 Subramanian<sup>[69]</sup>报道了一株 *Nocardia* 菌, 它可以通过将苯环氧化使邻二甲苯生成 3,4-二甲基儿茶酚。1987 年 Grazia<sup>[70]</sup>等分离到一株邻二甲苯降解菌 *Pseudomonas stutzeri*, 推测出邻二甲苯的代谢途径包括单加氧途径和双加氧途径, 形成中间代谢产物二甲基邻苯二酚。随后 Higson 和 Focht<sup>[71]</sup>从活性污泥中分离出一株邻二甲苯降解菌 *Pseudomonas cepacia* MB2, 研究报道了这株菌降解邻二甲苯的代谢途径, 其代谢产物依次为邻二甲苯、2-甲基苯甲醇、2-甲基苯甲醛、邻甲基苯甲酸、1,2-二羟基-6-甲基-3,5-二烯羧酸酯和 3-甲基儿茶酚, 随后进入甲苯代谢途径。代谢过程的酶包括二甲苯单加氧酶、苯甲醇脱氢酶、苯甲醛脱氢酶、甲苯甲酸盐双加氧酶等。

S. R. Bickerdike<sup>[34]</sup>等从土壤中分离出一株邻二甲苯降解菌 *Rhodococcus* sp. strain B3, 研究发现这株菌有两条代谢通路, 第一条为氧化邻二甲苯的一个甲基形成 2-甲基苯甲醇, 随后被氧化为 2-甲基苯甲酸, 再成为 3-甲基儿茶酚, 即单加氧途径。第二条包括氧化芳香环形成二甲基邻苯二酚, 即双加氧途径。Dockyu Kim<sup>[37, 46, 72]</sup>等从土壤中分离出一株邻二甲苯降解菌 *Rhodococcus* sp. strain DK17, 研究报道了这株菌的邻二甲苯代谢途径, 其代谢产物依次为邻二甲苯、邻二甲苯二氢二醇、二甲基邻苯二酚和 2-羟基-5-甲基-6-氧代-庚-2,4-二烯酸脂, 随后进入三羧酸循环。代谢过程的酶包括邻二甲苯双加氧酶、顺式二氢二醇脱氢酶、邻苯二酚双加氧酶等。

Jianming Yu<sup>[42]</sup>等对邻二甲苯降解菌 *Zoogloea resiniphila* HJ1 进行研究, 其降解邻二甲苯的代谢产物依次为邻二甲苯、邻二甲苯二氢二醇、二甲基邻苯二酚和 1,2-二甲基-1,3-二烯丁二酸, 随后进入三羧酸循环。代谢过程中的酶包括邻二甲苯双加氧酶、顺式二氢二醇脱氢酶、邻苯二酚 1,2-双加氧酶等。陈佩<sup>[39]</sup>从焦化废水污染的土壤中分

分离出一株邻二甲苯降解菌 *Pseudomonas aeruginosa* sp., 这株菌可以与其它菌株复配后降低焦化废水中的化学需氧量, 但是并未对其代谢途径进行研究。Euisoon Jeong<sup>[32]</sup>等从污水处理厂的活性污泥中分离出一株邻二甲苯降解菌 *Rhodococcus* sp. BTO62, 对其降解能力进行研究。实验表明, 这株菌对邻二甲苯的去除率高达 90 %, 在无菌条件下的去除效率为  $41 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ , 在开放条件下的去除效率为  $160 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ , 但未对此菌的代谢过程进行研究。

目前已报道的邻二甲苯降解菌包括 *Pseudomonas*、*Rhodococcus*、*Nocardia*、*Zoogloea* 等, 但是对于邻二甲苯降解菌降解邻二甲苯代谢的分子机制的相关报道较少, 且尚未发现使用转录组学方法对邻二甲苯代谢分子机制研究的报道, 因此对降解邻二甲苯的分子机制以及菌株全局调控的研究具有重要意义。

## 1.6 研究的目的及意义

邻二甲苯是一种疏水性的有机物, 并且广泛存在于环境中, 因此找到切实有效的降解邻二甲苯的方法是非常有必要的。生物法是利用微生物将 VOCs (视为其碳源或能源) 降解为 CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O 和生物质等无害物质。与传统的物理和化学方法 (如吸收法、燃烧法等) 相比, 生物法具有操作简便、低成本、高效率、无再生污染等特性, 目前已经成为国际上 VOCs 治理的新兴焦点。由于自然界中存在各种各样的微生物, 几乎绝大部分的有机污染物都可以被它们分解。本论文以邻二甲苯作为目标对象, 从二甲苯生物滴滤降解反应器的生物膜上中筛选邻二甲苯降解菌, 以期获得能够高效降解邻二甲苯的菌株, 为今后工业中生物法降解邻二甲苯气体奠定工作基础。

微生物在 VOCs 的生物处理系统中起着主导的作用。邻二甲苯废气生物处理效果是微生物代谢的结果, 也就是说, 系统的宏观处理能力在很大的程度上受微生物菌群的生长情况所影响。因此, 本课题拟通过研究菌株的最适 pH 值、最适温度等反应条件, 提供更多关于生物学机制的相关信息, 有助于生物法在邻二甲苯的降解过程中进行实际应用, 为微生物制剂的构建和工程设计提供了一定的理论依据和参考价值。

随着生物法在治理 VOCs 领域的逐渐应用, 有了一定的发展, 但是仅仅局限于宏观生物学效应及应用方面, 对于微生物细胞生长代谢过程的分子机制研究较少。对于二甲苯这种有机污染物来说, 虽然在有氧条件下能够降解间二甲苯或对二甲苯的细菌及其相应的分解代谢途径已经得到了很好的验证, 但是能够降解邻二甲苯的细菌并不多见, 其代谢途径目前还处在假设和推测的阶段。

综上所述, 不论是从科学自身的发展来看, 还是从理论需要和实际应用来看, 都需要对邻二甲苯降解菌降解邻二甲苯过程的分子机制进行研究, 为微生物在 VOCs 生物治理中的应用提供理论依据。通过利用转录组学的方法, 从全局角度对邻二甲苯降解菌降解邻二甲苯过程的分子机制进行研究, 不仅在理论方面可以更好地掌握菌株在降解过程中的特点, 同时在环境保护领域也可以促进应用微生物进行 VOCs 处理的研究深度和广度。

生物法治理邻二甲苯是一项既能够解决环境问题又能够满足社会发展方向的重

要技术。对此，获得高效降解邻二甲苯的菌株并分析其代谢过程，从应用上可以促进 VOCs 的生物降解，推进应用微生物进行工业废气的研究深度，是非常具有现实意义和理论研究价值的。

## 1.7 本课题研究内容及技术路线

### 1.7.1 主要研究内容

本研究选定邻二甲苯作为目标污染物，采用二甲苯生物滴滤降解反应器的生物膜上的菌群进行筛选与驯化，获得了一株能够高效降解的细菌。对菌株降解邻二甲苯的最佳生长条件、分子机制等进行了实验研究，主要研究内容如下：

#### (1) 微生物对邻二甲苯的降解特性

通过以邻二甲苯为底物进行邻二甲苯降解菌的筛选，经分离纯化后获得一株能够高效降解邻二甲苯的菌株 LEJB-4，经 16s rDNA 测序并使用 BLAST 比对后，表明该菌株为红球菌属 (*Rhodococcus*)。

以 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 为研究菌株，以邻二甲苯作为唯一碳源，通过对其在不同温度、pH、底物浓度的条件下的生长情况进行监测，以测定菌株生长的最适条件。

利用分光光度法测定 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 在邻二甲苯无机盐培养基中的吸光度数值并绘制对应的曲线；利用气相色谱法监测延滞期、对数生长期前期、对数生长期中期和稳定期四个关键时期的邻二甲苯剩余浓度，并绘制降解曲线。

#### (2) 菌株降解邻二甲苯的分子机制

利用高通量测序技术对 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 四个关键生长点的菌体细胞依次进行总 RNA 的提取、RNA-Seq 文库制备和测序，对邻二甲苯条件下的表达谱进行分析，找出不同表达基因，并通过 COG 注释、GO 注释和 KEGG 注释阐明邻二甲苯主要代谢途径中关键基因在转录水平的变化。揭示蛋白表达机制，从而为工程菌的进一步分子改造及发酵优化提供理论指导。

### 1.7.2 技术路线

本课题对邻二甲苯降解菌进行筛选和鉴定，并且测定了菌体在邻二甲苯环境下的最适生长条件。然后针对该菌株对邻二甲苯降解过程中不同时间点（迟滞期、对数生长期前期、对数生长期中期和稳定期）的菌体进行转录组学研究。其技术路线如图 1-3 所示。

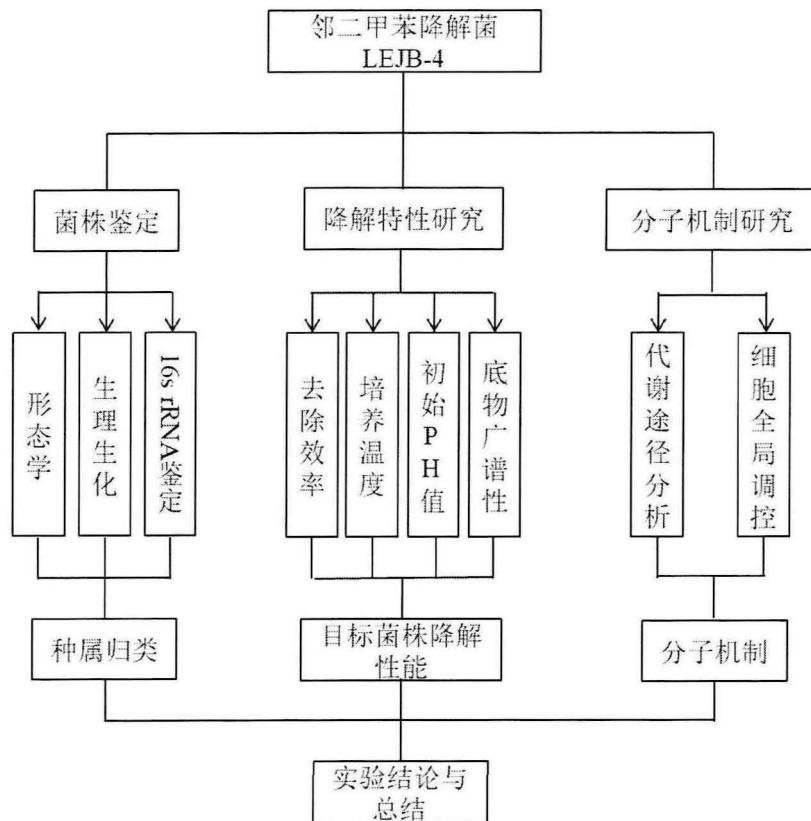


图 1-3 技术路线图

Fig. 1-3 Technology roadmap for research

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 药品试剂

实验中所用到的药品试剂主要是用于菌种分离的培养基制备以及废气的配制等，主要的药品试剂如表 2-1 所示：

表 2-1 实验中主要的药品试剂

Table 2-1 Major reagents in the experiment

药剂名称	规格	生产厂家
邻二甲苯	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
间二甲苯	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
对二甲苯	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
苯	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
甲苯	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
氯苯	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
苯乙烯	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
二硫化碳	分析纯	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
磷酸二氢钾	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
磷酸氢二钾	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
硝酸铵	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
七水硫酸镁	分析纯	天津化学试剂一厂
无水氯化钙	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氯化钠	分析纯	北京现代东方精细化学品有限公司
氯化钴	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
硫酸亚铁铵	分析纯	天津市风船化学试剂科技有限公司
硫酸锰	分析纯	天津大学科威公司
氯化镍	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氮三乙酸	分析纯	天津希恩思生化科技有限公司
钼酸钠	分析纯	天津市化学试剂四厂
亚硒酸钠	分析纯	天津化学试剂三厂
钨酸钠	分析纯	天津市瑞金特化学品有限公司
硫酸锌	分析纯	天津市赢达稀贵金属有限公司
无水硫酸钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
琼脂	生化试剂	天津嘉冠生物技术开发中心
酵母粉	生化试剂	北京奥博星生物技术公司

蛋白胨

生化试剂

北京奥博星生物技术公司

### 2.1.2 实验仪器

实验中所用到的仪器设备主要用于样品的分析，DNA 的提取以及菌种的分离纯化等操作，主要的仪器设备如表 2-2 所示：

表 2-2 实验中主要的仪器设备

Table 2-2 Major instruments and equipments in the experiment

实验仪器	型号	生产厂家
电热恒温水浴锅	DK-8D	上海精宏实验设备有限公司
电子天平	PL3002	梅特勒-托利多仪器有限公司
电子天平	AL204	梅特勒-托利多仪器有限公司
pH 计	S20K	梅特勒-托利多仪器有限公司
可见分光光度计	UV-1800	日本岛津有限公司
生化培养箱	SPX-250B5	上海新苗医疗器械制造有限公司
卧式恒温振荡器	IS-RDH1	美国精骐有限公司
全自动凝胶成像仪	170-8170	美国伯乐公司
高速冷冻离心机	5810R	美国热电公司
PCR 基因扩增仪	PCT-0220	美国伯乐公司
电泳仪	DYY-4c	北京市六一仪器厂
光学显微镜	BK5000	北京中显恒业仪器仪表有限公司
微量离心机	SORVALL	美国热电公司
超纯水系统	Cascade LS MK2	美国颇尔公司
电热恒温干燥箱	DG-201	太仓市实验设备厂
高压蒸汽灭菌锅	MLS-3750	日本三洋公司
紫外洁净工作台	BSC-1000IIB2	苏州安泰空气技术有限公司
气相色谱仪	GC9790-J	浙江福立分析仪器有限公司
气质联用仪	Agilent 7890A	美国安捷伦科技有限公司
扫描电子显微镜	SU 8010	日本日立公司
透射电子显微镜	HT 7700	日本日立公司
超声波清洗机	SB-5200D	宁波新芝生物科技有限责任公司
磁力搅拌器	RH B2	德国 IKA 公司
漩涡混合器	QL-901	其林贝尔仪器制造公司

### 2.1.3 主要培养基及缓冲液

实验中常用到的缓冲溶液和培养基如下：

(1) 50 × TAE 缓冲液：称取 242 g 三羟甲基氨基甲烷，然后加入 57.1 mL 冰乙酸，100 mL 0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8.0)，之后用蒸馏水定容至 1 L，放置室温保存

备用。

(2) 10 × PBS 缓冲液 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) : NaCl 80, KCl 2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  14.4,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.4, 用 HCl 调节 pH 至 7.4, 121 ℃条件下灭菌 20 min, 室温保存备用。

(3) 无机盐培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) :  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2$  0.02, 微量元素液 1 mL, pH 7.0, 121 ℃灭菌 20 min。微量元素 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) :  $\text{CoCl}_2$  0.2,  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.8,  $\text{MnSO}_4$  1.0,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.2, 氮三乙酸 2.0,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0.02,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  0.1,  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{ZnSO}_4$  1.0。

(4) Luria-Bertani (LB) 培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) : 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 酵母粉 5.0, 调节至 pH 值 7, 121 ℃灭菌 20 min。

(5) 固体培养基: 在对应的培养基中加入琼脂 15.0 ~ 20.0 g, 平板固体培养基在倒置状态下于 30℃静置培养。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 邻二甲苯降解菌的筛选鉴定

#### 2.2.1.1 邻二甲苯降解菌筛选

通过图 2-1 中所示的方法从二甲苯生物滴滤降解反应器的生物膜上中筛选高效邻二甲苯降解菌。概括来说, 整个筛选过程为“富集培养-初筛-复筛”, 经过两次筛选, 最终获得高效降解邻二甲苯的菌株。具体步骤如下:

称取 2 g 菌膜样品于 50 mL 无菌水中, 30℃, 180 rpm 条件下避光培养 3 h, 然后静置 1 h。

取 10 mL 上清液转接至 100 mL 新鲜的 LB 培养基中, 30 ℃、180 rpm 条件下培养 24 h 以进行富集培养。

取 10 mL 富集后的菌液转接至 100 mL 无机盐培养基中, 添加邻二甲苯作为唯一碳源和能源, 使邻二甲苯的初始浓度维持在  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 相同的培养条件下培养 24 h, 然后重复该步骤 4 次。

取驯化后的培养基上清液, 稀释  $10^4 \sim 10^6$ , 将其均匀涂布在含邻二甲苯的无机盐固体平板上进行初筛(邻二甲苯溶液加至无菌棉球中, 以挥发至固体平板表面供菌体利用), 30 ℃恒温培养箱培养。

挑选出能在邻二甲苯无机盐固体平板中生长的菌株, 并利用平板划线的方法纯化菌株, 以挑取单克隆。

对得到纯菌进行邻二甲苯降解效率测定, 通过检测邻二甲苯降解效率高低进行终筛, 筛选高效邻二甲苯降解菌。

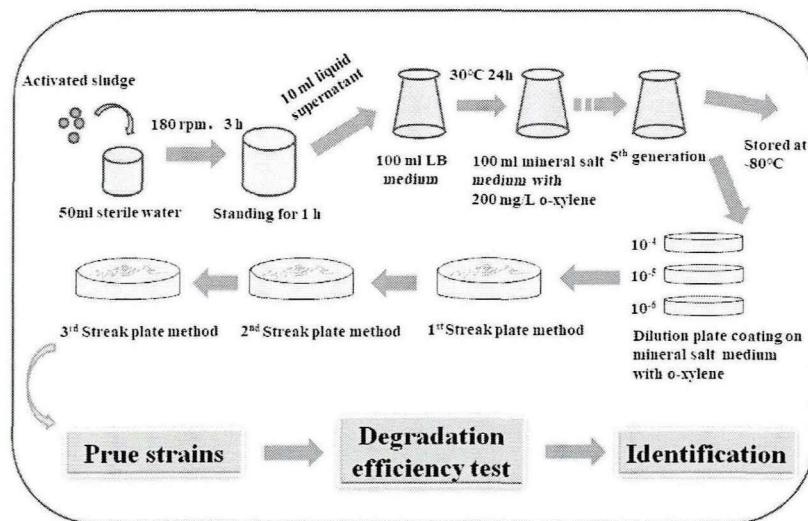


图 2-1 邻二甲苯降解菌筛选过程

Fig.2-1 Screening process of o-xylene degrading bacteria

### 2.2.1.2 邻二甲苯降解菌鉴定

邻二甲苯降解菌的鉴定分为两个部分，一部分为 16S rDNA 鉴定，另一部分为生理生化鉴定。16S rDNA 鉴定步骤如下：

细菌总 DNA 提取。利用北京聚合美生物科技公司的 M5 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取邻二甲苯降解菌的全基因组。

PCR 产物的制备。以全基因组为模板，利用引物 27F(5'-AGAGTTGATCCTGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGCTT-3') 扩增邻二甲苯降解菌的 16S rDNA。PCR 反应体系为 50 μL 反应体系，其中包括：DNA 模板，2 μL；引物 27F (10 μM)，2 μL；引物 1492R(10 μM)，2 μL；2 × Taq PCR Master Mix，25 μL；无菌水，21 μL。PCR 反应程序为：预变性 95 °C，3 min；变性 95 °C，40 s；退火 55 °C，30 s；延伸 72 °C，1.5 min；循环 32 次；最后延伸 72 °C，10 min。扩增后的 PCR 产物送往金唯智测序公司进行测序。

根据测序得到的 16S rDNA 序列，从 NCBI 数据库上进行同源性比较，鉴定邻二甲苯降解菌的种属，并利用软件 MEGA 5.0 构建系统进化树。

### 2.2.1.3 细胞形态检测

#### (1)革兰氏染色样品制备流程

取材：取一滴生理盐水滴至载玻片上，挑取菌体溶于生理盐水中，使其形成一层菌膜。

染色：待其自然风干后，在表面分别滴入结晶紫、碘液、酒精、番红进行染色、媒染、脱色、复染。然后进行显微镜观察。

#### (2) 扫描电镜样品制备流程

取材：将样品 5000 × g, 4 °C 离心 5 min, 富集细胞样品。0.1M PBS 缓冲液清洗

3 次以上，去除培养基中的杂质。

**固定：**将细胞用 2.5 % 戊二醛浸泡并悬浮，4 °C 冰箱固定过夜。0.1M PBS 缓冲液冲洗 3 次，每次浸泡 10 min，以便避免戊二醛对后续实验的影响。离心富集后加入 1 % 银酸，待其覆盖细胞后，将细胞悬浮固定 1 h。之后用 0.1M PBS 缓冲液冲洗 3 次，每次 10 min。

**梯度脱水：**逐步用 30 %、50 %、75 %、95 %、100 %、100 % 乙醇梯度脱水，每次 15 min，可重复一次。

**临界点干燥：**利用临界点干燥仪将细胞中的乙醇置换为液态 CO<sub>2</sub>，再经液态 CO<sub>2</sub> 的气化过程，将 CO<sub>2</sub> 气体排出，得到干燥的样品。

**镀膜：**利用离子溅射仪将铂 (Pt) 均匀覆盖在样品表面，以增加生物样品的导电性。

**观察：**选择合适的参数，进行扫描电镜的观察<sup>[73]</sup>。

### (3) 透射电镜样品制备流程

**取材：**将样品 5000×g，4 °C 离心 5 min，富集细胞样品。0.1M PBS 缓冲液清洗 3 次以上，去除培养基中的杂质。

**固定：**2.5 % 戊二醛浸泡并将细胞悬浮于固定剂中，4 °C 冰箱固定过夜。缓冲液冲洗 3 次，每次浸泡 10 min，以便避免戊二醛对后续实验的影响。离心富集后加入 1 % 银酸，待其覆盖细胞后，将细胞悬浮固定 1 h。之后用缓冲液冲洗 3 次，每次 10 min。

**梯度脱水：**逐步用 30 %、50 %、75 %、95 %、100 %、100 % 乙醇梯度脱水，每次 15 min。

**置换：**采用不同浓度的包埋剂逐步代替细胞内的乙醇。无水乙醇：包埋剂 = 1:1 置换 1 h。纯包埋剂置换过夜。更换纯包埋剂再次置换 1 h。

**包埋：**重复更换包埋剂后将其置于烘箱中 80 °C 加热 8 h，使样品最终成为包埋块。

**超薄切片：**样品处于包埋块中，将其处理为平面，再使用超薄切片机将样品切成 50 - 100nm 的薄片。将样品薄片吸附至带有支撑膜的铜网上，晾干备用。

**电子染色：**使用醋酸铀和柠檬酸铅对薄片进行染色两次，使样品的颜色较背景更加明显，以便进行观察。

**透射电镜观察：**使用透射电子显微镜对样品进行结构观察<sup>[73]</sup>。

## 2.2.2 菌株最适生长条件的研究

### 2.2.2.1 最适温度

将邻二甲苯降解菌接种至 100 mL LB 培养基中，在 30 °C、180 rpm 条件下进行活化。待菌体生长至对数期，取 10 mL 菌液，7000 rpm 离心 8 min，去上清后将菌体使用 PBS 缓冲液洗涤 2 次，除去菌体表面的少量培养基。随后菌体被转接至含邻二甲苯无机盐培养基中。设定 6 个实验组，其培养温度分别为 20 °C、25 °C、30 °C、37 °C、45 °C、50 °C，每个实验组设三组平行，分别测定其 OD<sub>600</sub> 值以检测菌体生长的最适温度。

### 2.2.2.2 最适 pH

将邻二甲苯降解菌接种至 100 mL LB 培养基中，在 30 °C、180 rpm 条件下进行活化。待菌体生长至对数期，取 10 mL 菌液，7000 rpm 离心 8 min，去上清后将菌体使用 PBS 缓冲液洗涤 2 次，随后菌体被转接至含邻二甲苯无机盐培养基中。设定 5 个实验组，其 pH 分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0，每个实验组设三组平行，分别测定其 OD<sub>600</sub> 值以检测菌体生长的最适 pH。

### 2.2.2.3 底物广谱性研究

将邻二甲苯降解菌接种至 100 mL LB 培养基中，在 30 °C、180 rpm 条件下进行活化。待菌体生长至对数期，取 10 mL 菌液，7000 rpm 离心 8 min，去上清后将菌体使用 PBS 缓冲液洗涤 2 次，随后菌体被转接至含不同碳源的无机盐培养基中。碳源分别为邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、苯、甲苯、氯苯和苯乙烯。分别测定其 OD<sub>600</sub> 值以检测菌株的底物广谱性。

## 2.2.3 邻二甲苯的测定

### 2.2.3.1 气体中的邻二甲苯

#### (1) 检测方法及条件

采用六通阀进样的方法，通过气相色谱仪（福利 9790，中国）所配备的氢离子化火焰检测器（FID）来测定邻二甲苯的浓度。气相色谱柱选用填充柱（10 % SE - 30，0.6 m × Φ3 mm）。气相色谱条件为：氮气的流速为 50 mL·min<sup>-1</sup>，柱前压为 0.08 Mpa，进样口的温度为 160 °C，柱温为 90 °C，检测器的温度为 140 °C。

#### (2) 标准曲线的绘制

将邻二甲苯与纯净空气混合，配制成已知浓度的标准气体，然后进行对峰面积定量分析来制作标准曲线。将容积为 1150 mL 的厌氧玻璃瓶洗净烘干，用进口蓝色丁基橡胶塞和铝盖将瓶口密封，然后用注射器注射 60 μL 的邻二甲苯溶液于瓶内，等待邻二甲苯从液态完全挥发成气态并充分扩散混匀（约 5 h），所配气体的浓度按照下式（2-1）来计算：

$$C = \frac{\rho \times V_1}{V_b} \quad \text{式 (2-1)}$$

式中：C 为所配气体浓度 (g·m<sup>-3</sup>)；ρ 为邻二甲苯液体的密度 (g·mL<sup>-1</sup>)；V<sub>1</sub> 为邻二甲苯液体的体积 (mL)；V<sub>b</sub> 为厌氧玻璃瓶的体积 (mL)。将上述所配气体作为原始母气，用注射器抽取不同体积的母气注射至 130 mL 的厌氧玻璃瓶中，清洁空气作为稀释气体，以配制出不同浓度梯度 (0.0765、0.153、0.3061、0.4591、1.996、3.99 和 4.99 g·L<sup>-1</sup>) 的邻二甲苯气体，待气体均匀混合后（约 30 min），利用气相色谱法对峰面积进行测定。每个样品平行至少测定 3 次，并且以峰面积测量值的平均值作为该样品的测定结果。

经过上述实验的多次重复，利用邻二甲苯浓度与气相色谱法所测得的峰面积建立

标准曲线，如图 2-2 所示。由图可知标准曲线具有良好的相关性， $R^2$  值达到 0.9990，因此标准曲线  $y = 7E-07x - 0.0017$  可用于后续计算厌氧瓶中剩余邻二甲苯的质量。

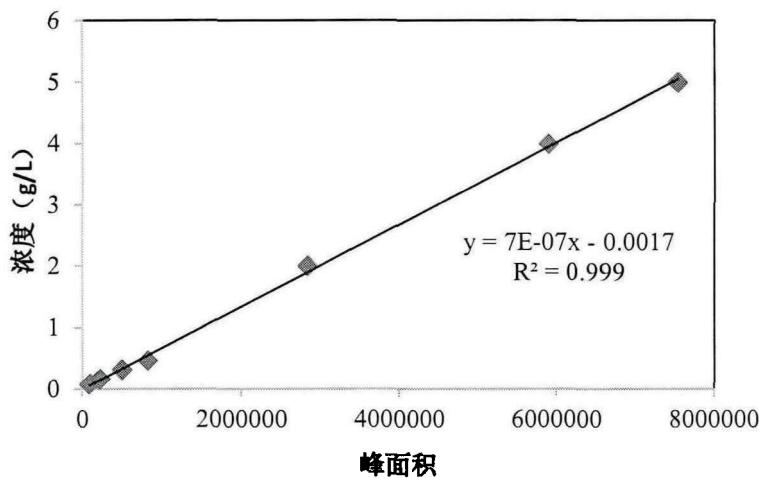


图 2-2 邻二甲苯气体的标准曲线

Fig.2-2 Standard curve of o-xylene

### 2.2.3.2 培养液中的邻二甲苯

#### (1) 检测方法的建立

使用气相色谱仪（福利 9790，中国）来测定液体中邻二甲苯的浓度，要求配备有氢离子化火焰检测器（FID），样品进样方式采用液体进样器自动进样，每次进样体积均为 1.5  $\mu\text{L}$ 。气相色谱柱选用 Wondacap 5 毛细管柱（0.32 mm ID  $\times$  30 m,  $df = 0.25 \mu\text{m}$ ）。具体的气相色谱条件：氮气的流速为 50  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，柱前压为 0.08 Mpa，进样口的温度为 180  $^{\circ}\text{C}$ ，柱温为 60  $^{\circ}\text{C}$ ，检测器的温度为 190  $^{\circ}\text{C}$ 。此条件下，可有效分离出邻二甲苯。

邻二甲苯样品前处理方法为：取 20 mL 含邻二甲苯的培养液于 125 mL 的分液漏斗中，使用盐酸将其 pH 值调节为酸性（pH < 2），加入 3 ~ 4 g NaCl，溶解后加入 5.0 mL 的二硫化碳溶液，立即盖紧盖子，持续振荡 3 min，在此期间不时进行放气，然后使其静置分层，收集下部萃取相，随后再加入 5.0 mL 二硫化碳溶液对样品进行二次萃取，最后将两次的萃取相进行混合，使用 150  $^{\circ}\text{C}$  下烘干的无水硫酸钠脱水并用 0.22  $\mu\text{m}$  的有机滤膜过滤后，转移至棕色液相小瓶进行气相检测。最终根据峰面积的数值与邻二甲苯液体的标准曲线来计算从培养液中剩余邻二甲苯的质量<sup>[74]</sup>。上述方法具有操作简单、精确度高等优点，适用于测定培养液中的邻二甲苯浓度。每个样品设置三组重复，并且以 3 次重复的平均值 ( $n = 3$ ) 作为培养液中邻二甲苯的终浓度。

#### (2) 标准曲线的制作

使用二硫化碳溶液作为溶剂，配制浓度为 27.5、55、110、220、440、880、1760  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的邻二甲苯标准溶液，将其分别转移至棕色液相小瓶中，然后使用气相色谱法进行测定。邻二甲苯的液体标准曲线如图 2-3 所示，由图可知标准曲线的相关性较好，

$R^2$  值达到 0.9996，因此标准曲线  $y = 0.0004x + 5.7686$  可用于后续计算培养液中剩余邻二甲苯的质量。

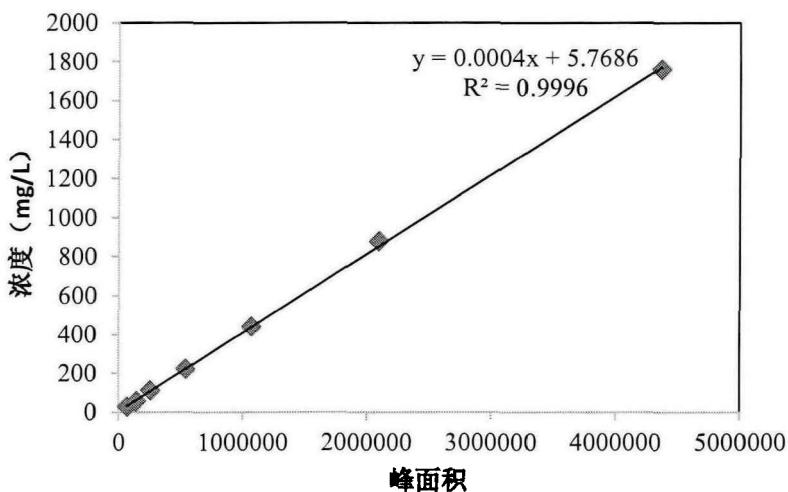


图 2-3 邻二甲苯在液体中的标准曲线

Fig.2-3 Standard curve of o-xylene in liquid

#### 2.2.4 菌株的生长曲线与邻二甲苯的降解曲线的绘制

将邻二甲苯降解菌接种至 100 mL LB 培养基中，在 30 °C、180 rpm 条件下进行活化。待菌体生长至对数期，取菌液 7000 rpm 离心 8 min，去上清后将菌体使用 PBS 缓冲液洗涤 2 次，除去菌体表面的少量培养基。随后菌体以 10 % 接种量转接至体积为 330 mL 的厌氧瓶中，其中包含 20 mL 含邻二甲苯无机盐培养基，30 °C、180 rpm 条件下摇床培养。采用分光光度法  $\lambda = 600 \text{ nm}$  处 ( $\text{OD}_{600}$ ) 测定菌液的吸光值，同时对培养体系中邻二甲苯（气态邻二甲苯与培养液中的邻二甲苯）的剩余量进行测定，每个实验重复 3 次。以生长时间为横坐标，OD 值和邻二甲苯剩余量分别为纵坐标，制作生长曲线。

#### 2.2.5 转录组取样点的确定及样品的收集

根据生长曲线和邻二甲苯的降解曲线的变化趋势，从而选定迟滞期 (T1)、对数期前期 (T2)、对数期中期 (T3) 和稳定期 (T4) 四个时间点作为取样点。当菌体生长到达取样点时，迅速收集菌液，4 °C、12000 rpm 条件下离心 5 min，去上清后将菌体置于液氮中以冷冻菌体，使细胞内的代谢反应停止，随后转移至 -80 °C 超低温冰箱进行保藏，每个取样点的取样重复 2 次，用于后续分子实验。

#### 2.2.6 样品总 RNA 的提取及纯化

取出早期存放于 -80 °C 超低温冰箱中的四个时间点收集的菌体，分别进行 RNA 的提取。收集细胞并用 1 mL RNase-free H<sub>2</sub>O 吹打清洗，12000 rpm 离心后弃上清。用 100  $\mu\text{L}$  5 mg·mL<sup>-1</sup> 溶菌酶吹散细胞后加适量 glass beads，37 °C 孵育 3 min，vortex 震荡 1 min，重复 3 次。然后使用 QIAGEN RNeasy Mini Kit 进行 RNA 纯化，使用 QIAGEN

RNase-Free DNase Set 去除 DNA 污染。随后用 1 %琼脂糖凝胶电泳对 RNA 完整性进行检测。取 5  $\mu$ g total RNA 进行 mRNA 纯化，具体方法参照说明书 Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria)，利用 Agilent 2100 RNA 6000 Pico kit 检测结果。

### 2.2.7 cDNA 文库的构建、转录组测序和数据分析

利用 QIAseq Stranded Total RNA Lib Kit 对 mRNA 样品进行片段化、反转录、连接测序接头、文库选 size 、文库富集等。完成文库构建后用 Qubit dsDNA BR Assay Kits 对文库浓度进行测定。将构建好的文库送到诺禾致源进行测序，Novaseq 2 $\times$ 150 bp 测序。获得原始测序数据后，使用 FastQC 对测序数据进行质控，随后用 Hisat2 与参考基因组进行比对。测序结果比对后，用组装软件 String Tie 对转录本进行组装。对组装得到的 Unigene 序列与蛋白质数据库 KEGG 和 COG 做 blastx 比对，然后对基因进行注释和分类，通过观察样品间基因表达水平(RPKM 值)的差异倍数，把那些 p-value  $\leq 0.05$  和  $|\log_2 FC| \geq 1$  的基因作为差异表达基因 (DEGs)，并对其进行 GO 分类和 Pathway 富集分析。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 邻二甲苯降解菌筛选和鉴定

##### 3.1.1 邻二甲苯降解菌的筛选

邻二甲苯降解菌是污染物邻二甲苯生物治理研究的一项重要内容。但在邻二甲苯降解菌的筛选过程中，传统的方法具有时间长，操作繁琐等缺点。为了快速获得高效的邻二甲苯降解菌，本论文选用二甲苯生物滴滤降解反应器的生物膜中的菌群，通过“LB 培养基富集、无机盐培养基初筛、无机盐平板复筛”的方法，实现了快速获得邻二甲苯高效降解菌的目标。

经过无机盐固体培养基复筛后，共挑选出 7 株单克隆能够在以邻二甲苯为唯一碳源的无机盐固体培养基上生长，将其作为候选菌株进行平板划线，以获得纯菌株，分别命名为 LEJB-2 ~ LEJB-8。

随后，使用气相色谱法对这 7 株菌的邻二甲苯降解功能进行检测分析。在 48 h 的培养时间内，共有 6 株菌的邻二甲苯降解效率高于 40%，如图所示，其中 LEJB-4 的降解能力明显高于其它菌株，降解效率高达 99%。所以，经过“LB 培养基富集、无机盐培养基初筛、无机盐平板复筛”的方法，获得了一株邻二甲苯高效降解菌 LEJB-4，并作为本论文的研究对象。

在邻二甲苯降解菌的筛选过程中，很多学者采用先富集培养，然后利用表面含有邻二甲苯的无机盐平板的方式进行邻二甲苯降解菌的筛选。但是，在上述筛选邻二甲苯降解菌的过程中，由于邻二甲苯是不溶性于水的且具有挥发性，所以将邻二甲苯涂布在平板上的操作比较复杂，且邻二甲苯在平板上分布不均匀，这使菌株在平板上生长较慢，进而导致整个筛选的周期比较长。

与上述筛选过程相比，本论文避开了利用表面含有邻二甲苯的平板进行降解菌筛选的过程，而是使用了无菌棉球置于平板内部，将邻二甲苯溶液注射至棉球中，利用邻二甲苯的挥发性使其均匀分布于平板上，以供菌株利用。进而使菌株可以快速生长，实现邻二甲苯降解菌的快速筛选。

##### 3.1.2 邻二甲苯降解菌鉴定

为了对所筛选到的 7 株邻二甲苯降解菌进行菌属鉴定，对这 7 株菌的 DNA 进行提取并扩增 16S rDNA 基因（图 3-1）。经金维智公司测序后，在 NCBI 网站对得到的 16S rDNA 序列与数据库中的菌株序列进行同源性比较。如表 3-1 所示，比对结果显示所筛选的 7 株邻二甲苯降解菌有 4 株为鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium*)，2 株为不动杆菌属 (*Acinetobacter*)，一株为红球菌属 (*Rhodococcus*)。

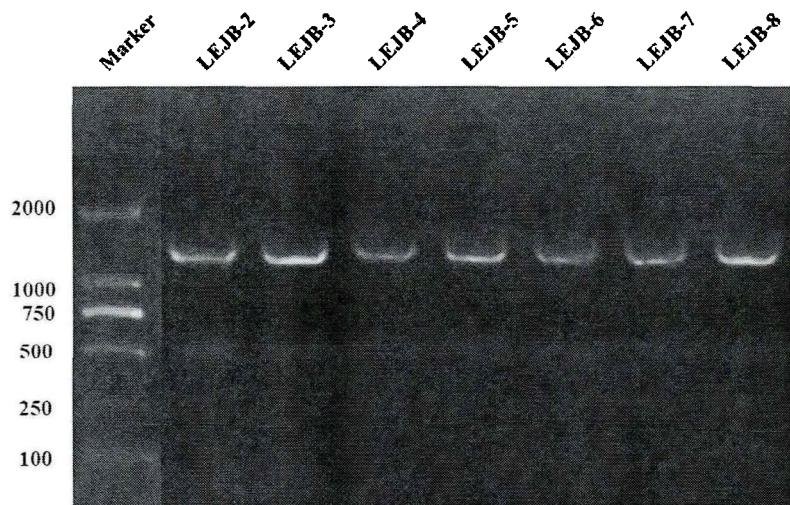


图 3-1 邻二甲苯降解菌 16S rDNA 的 PCR 产物

Fig.3-1 The 16S rDNA of o-xylene degrading strains

表 3-1 邻二甲苯降解菌 16S rDNA 序列比对结果

Table 3-1 The Blast result of 16S rDNA sequences of o-xylene degrading strains

菌株编号	系统类群	相似度	覆盖度
LEJB-2	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	99%	100%
LEJB-3	<i>Sphingobacterium siyangense</i>	99%	99%
LEJB-4	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	98%	99%
LEJB-5	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	99%	99%
LEJB-6	<i>Acinetobacter sp.</i>	100%	100%
LEJB-7	<i>Acinetobacter sp.</i>	100%	100%
LEJB-8	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	99%	100%

在所筛选到的 7 株邻二甲苯降解菌中，与其它 6 株菌株相比，菌株 LEJB-4 具有最高的邻二甲苯降解效率（图 3-2）。因此，本论文选择菌株 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 作为模式菌株进行邻二甲苯代谢机制的研究。

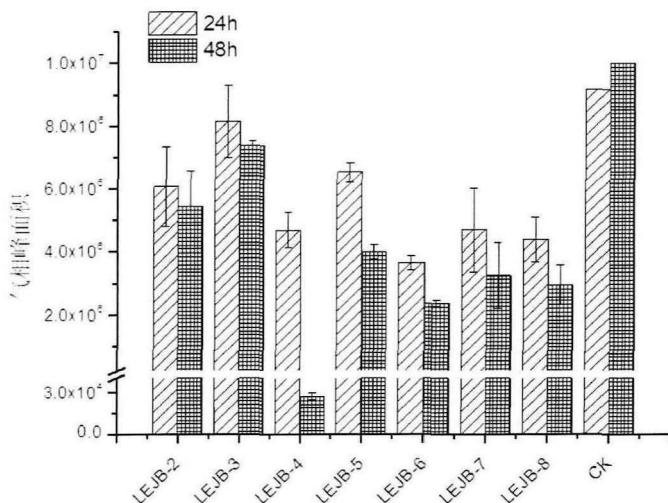
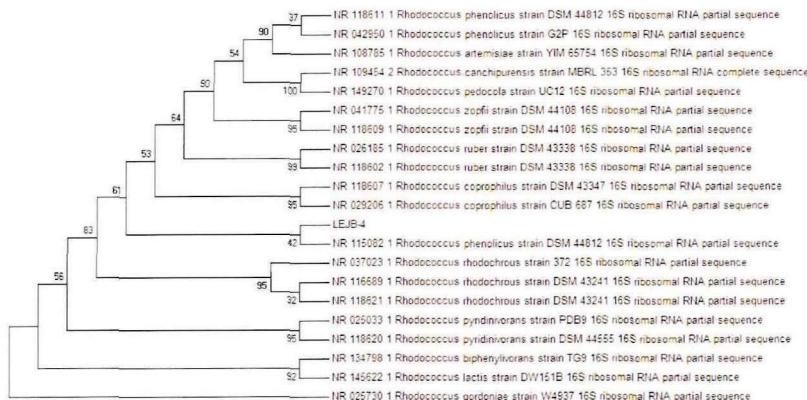


图 3-2 邻二甲苯降解菌的降解效率

Fig. 3-2 Degradation efficiency of o-xylene by isolated strains

此外，根据菌株 LEJB-4 的 16S rDNA 序列绘制了菌株 LEJB-4 的系统发育树（图 3-3）。由图可知，菌株 LEJB-4 与菌株 *Rhodococcus phenolicus* 的同源性最高。

图 3-3 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 系统进化树Fig. 3-3 Phylogenetic tree of *Rhodococcus* sp. LEJB-4

为了更好地对菌株 LEJB-4 进行鉴定，对其细胞形态、生理生化基本特性等进行观察分析。实验结果显示，在 LB 固体培养基上培养 5 d 后，菌株 LEJB-4 可见清晰的单菌落（图 3-4），菌落呈淡黄色，边缘呈非规则形状，长约 3~4 mm，菌落表面干燥粗糙，不透明。



图 3-4 菌株 LEJB-4 的单菌落

Fig.3-4 Single colony of strain LEJB-4

菌株 LEJB-4 经革兰氏染色，发现其染色后呈紫色（图 3-5），因此菌株 LEJB-4 属于革兰氏阳性菌。镜检结果表明菌株 LEJB-4 为棒状杆菌。上述结果显示菌株 LEJB-4 的生理生化特征与酚醛红球菌 (*Rhodococcus phenolicus*) 最接近。综上，结合 16S rDNA 鉴定和生理生化鉴定结果可判断，菌株 LEJB-4 归属酚醛红球菌 (*Rhodococcus phenolicus*)。



图 3-5 菌株 LEJB-4 的革兰氏染色

Fig.3-5 Gram stain of strain LEJB-4

### 3.1.3 细胞形态检测

为了从细胞形态的水平上分析邻二甲苯对菌株 LEJB-4 的影响，通过利用扫描电镜和透射电镜对 LB 培养环境与邻二甲苯培养环境下菌株 LEJB-4 的细胞形态变化进行观察，结果如图 3-6 所示。

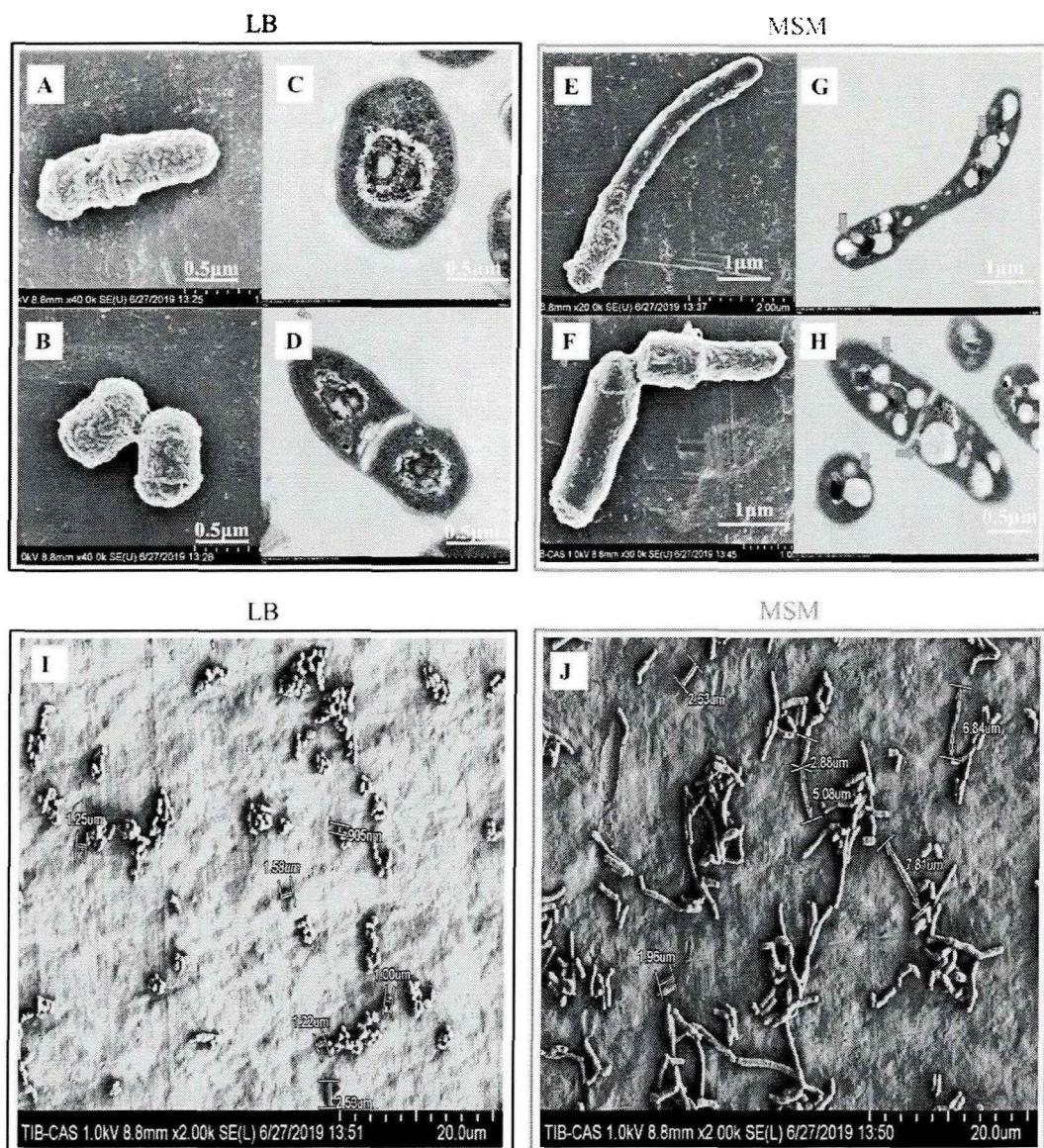


图 3-6 邻二甲苯环境对菌株 LEJB-4 细胞形态的影响

Fig.3-6 Morphological changes of *Rhodococcus* sp. LEJB-4 in the MSM and the biological control in the LB at mid-logarithmic phase. The figure A, E, B, F, I and J are the images of SEM; figure C, G, D and H are the images of TEM

菌株 LEJB-4 在对数生长期细胞的形态如图 3-6 所示，其中图 A、B、I 为 LB 培养基培养下菌株 LEJB-4 的扫描电镜图；图 C、D 为 LB 培养基培养下菌株 LEJB-4 的透射电镜图；图 E、F、J 为邻二甲苯无机盐培养基培养下菌株 LEJB-4 的扫描电镜图；图 G、H 为邻二甲苯无机盐培养基培养下菌株 LEJB-4 的透射电镜图。

由图 A、B、I 可知，在 LB 培养基中培养的菌株 LEJB-4 的细胞分布比较分散，只有部分聚集在一起，细胞形态较短，其长度约为  $2 \sim 5 \mu\text{m}$ 。由图 E、F、J 可知，在邻二甲苯无机盐培养基的培养下，菌株 LEJB-4 的细胞分布更加紧密，并且细胞形态较长，其长度约为  $2 \sim 8 \mu\text{m}$ 。图 C、D 中，可以看到菌株 LEJB-4 的细胞内部结构与

一般的原核生物相类似。图 G、H 中，发现细胞内部出现了白色阴影（箭头所示），表明菌体利用了邻二甲苯分子或产生中间代谢产物。根据菌株 LEJB-4 的单个细胞扫描电镜结果（图 A、B、E 和 F）和透射电镜结果（图 C、D、G 和 H）可以更加明显地发现菌株 LEJB-4 在邻二甲苯环境的作用下，其细胞形态会发生改变。

此外，学者 Gu<sup>[75]</sup>等曾研究发现，在有机物苯酚的作用下，不动杆菌 *Acinetobacter* sp. DW-1 细胞的生长会受到影响，细胞的分布变得更加紧密。从扫描电镜图中可以看出，邻二甲苯环境对邻二甲苯降解菌 LEJB-4 的生长分布产生了显著影响。

综上，邻二甲苯环境属于一种生物刺激，当微生物受到这种外源刺激后，出于适应机制及自我保护机制，可以使菌株 LEJB-4 细胞形态产生变化，同时使细胞的分布更加紧密，以适应邻二甲苯环境。但是，仅由扫描电镜和透射电镜结果还不能充分支持该结论，仍需要相关数据支持该结论。

### 3.2 菌株生长特性研究

根据邻二甲苯降解菌的生长情况，确定了菌株生长的最适条件，包括温度、pH 和底物广谱性研究，以对邻二甲苯降解菌的生长条件进行优化。在邻二甲苯的浓度为 200 mg·L<sup>-1</sup>，初始接种量为 10 % 的条件下，设定温度分别为 20 °C、25 °C、30 °C、37 °C、45 °C、50 °C，pH 分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0，底物分别为邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、苯、甲苯、氯苯和苯乙烯。

#### 3.2.1 最适温度

温度对微生物的影响是广泛的，改变温度必然会影响微生物体内所进行的多种生物化学反应<sup>[76]</sup>。微生物体内的蛋白质和酶都会受到温度的影响，因此，温度会对微生物的生长情况和降解效率起到关键作用。酶的活性曲线是一条抛物线，温度偏高和偏低都会使酶的活性下降，仅有在细胞最佳的温度下才会对微生物的生长繁殖和代谢有促进作用。在 pH 值为 7.0、摇瓶转速为 180 rpm 的条件下，在不同温度下菌株 LEJB-4 的生长情况如图 3-7 所示。

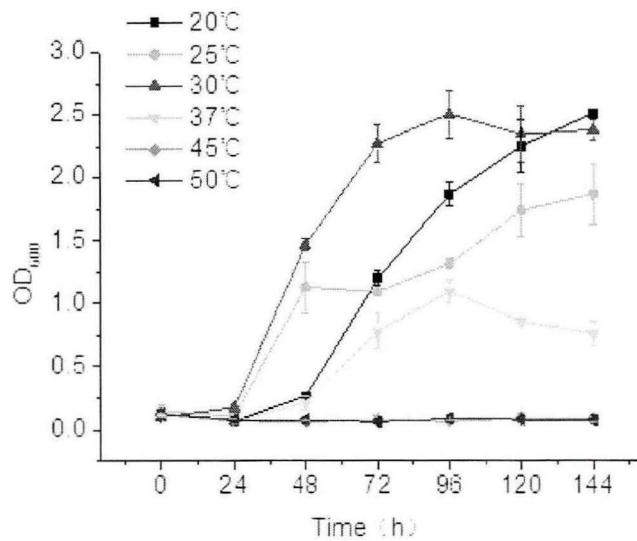


图 3-7 温度对邻二甲苯降解菌 LEJB-4 生长的影响

Fig.3-7 Effect of temperature on the growth of o-xylene degrading bacteria LEJB-4

由图可知，在 20~30 °C之间，由于温度逐渐升高，邻二甲苯降解菌的生长速率变快，在 30 °C下最快，但在 37 °C下有所下降，超过 45 °C后菌体已经不能生长。此现象可能是由于 25 °C时温度较低导致细胞内酶的活性变差，使菌株的降解能力变差；45 °C时温度偏高，使得细胞内蛋白质和酶的活性降低甚至失去活性。在 25 ~ 30 °C时，菌体的生长在 24 h 时就进入对数生长期，而其它温度下一般从 48 h 开始。由此可见温度对菌株生长的影响是显著的。因此，菌株 LEJB-4 的最适生长温度为 30 °C。

### 3.2.2 最适 pH

pH 对微生物的生长具有显著影响<sup>[77, 78]</sup>，多表现为以下几个方面：一是由于蛋白质、核酸等生物大分子物质的电荷发生改变，导致生物活性降低；二是细胞膜上的电荷会发生改变，使细胞膜控制物质进出的能力变弱；其三是会使细胞吸收的营养物质发生改变。微生物多在一定的 pH 范围内生长，不同微生物生长的最适 pH 范围有所不同，证明微生物具有适应环境的能力。

*Rhodococcus* sp. LEJB-4 为异养微生物，这类微生物大多适合生存于中性环境且 pH 的影响较为显著。因此，偏低或偏高的 pH 均会改变微生物蛋白或酶的活性，从而对菌体的降解性能产生影响。经 Wang<sup>[79]</sup>等人的研究发现生物对二甲苯的代谢过程中会产生有机酸。同时，微生物降解 VOCs 是好氧过程，最终会降解为 CO<sub>2</sub>，使菌体生长环境的 pH 值发生改变。

因此，在温度为 30 °C、摇床转速为 180 rpm 的条件下，研究了不同的初始 pH 值（5.0、6.0、7.0、8.0、9.0）对邻二甲苯降解菌生长情况的影响。如图 3-8 所示，在初始 pH 为 7.0 时菌株 LEJB-4 的生长情况最好，在 96 h 时有最高 OD<sub>600</sub> 值为 2.560；当初始 pH 在 5.0 和 6.0 时，OD<sub>600</sub> 值基本未发生变化，菌体在酸性条件下难以生长，表明 pH 偏低会影响邻二甲苯降解菌 LEJB-4 的生长；当初始 pH 为 8.0 和 9.0 时，菌体生长速率较初始 pH 为 7.0 条件下慢，但是其 OD<sub>600</sub> 值在持续不断的升高，其原因可能为微生物降解邻二甲苯会产生酸性代谢产物导致 pH 逐渐降低所造成的。此结果表明，过度酸性或者碱性的环境都会抑制微生物的活性。因此，邻二甲苯降解菌 LEJB-4 降解的最适 pH 在 7.0 左右。

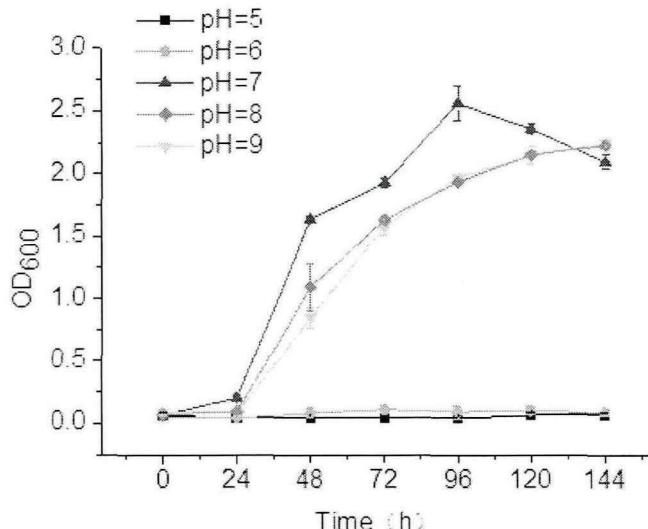


图 3-8 pH 对邻二甲苯降解菌 LEJB-4 生长的影响

Fig.3-8 Effect of pH on the growth of o-xylene degrading bacteria LEJB-4

### 3.2.3 底物的广谱性

菌株 LEJB-4 在分别以不同底物作为碳源的培养基中生长 96 h 后的生长情况如表 3-1 所示，在碳源为苯、甲苯等苯系物的培养基中较好的生长，由于其分子结构与邻二甲苯都具有苯环结构，LEJB-4 可以耐受此类有毒的化合物并将其作为碳源进行利用，维持自身的生长；间二甲苯、对二甲苯与邻二甲苯虽然是同分异构体，但 LEJB-4 不能在含间二甲苯和对二甲苯的培养基中生长，这可能是由于甲基在苯环上的位置不同，邻二甲苯更易于被 LEJB-4 利用，此结论与 Alessandra<sup>[47]</sup>等报道的观点一致；对于氯苯和苯乙烯这类物质，LEJB-4 则不具备降解能力。由表 3-2 可以看出，菌株 LEJB-4 可降解多种有机物，因而可以在多成分混合的苯系物废气降解时发挥重要作用，这对多成分混合废气的治理具有重要意义。

表 3-2 底物广谱性分析

Table 3-2 Substrate diversity analysis

不同底物 ( $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	结果
苯	+
甲苯	++
邻二甲苯	+++
间二甲苯	-
对二甲苯	-
氯苯	-
苯乙烯	-

+++：OD>1；++：OD=0.5~1.0；+：OD<0.5；-：不生长

### 3.3 菌株 LEJB-4 降解邻二甲苯的特性研究

在邻二甲苯降解菌的筛选过程中，菌株 LEJB-4 在含邻二甲苯无机盐培养基中表现出较好的生长能力。但是，为了能够快速筛选出高效的邻二甲苯降解菌，在筛选过程中的复筛过程只是对菌株 LEJB-4 在 48 h 内的降解能力进行检测。为了更深入的了解菌株对邻二甲苯的降解活性，特在一个完整的培养周期内分析了菌株的生长情况及邻二甲苯质量的变化（图 3-9）。

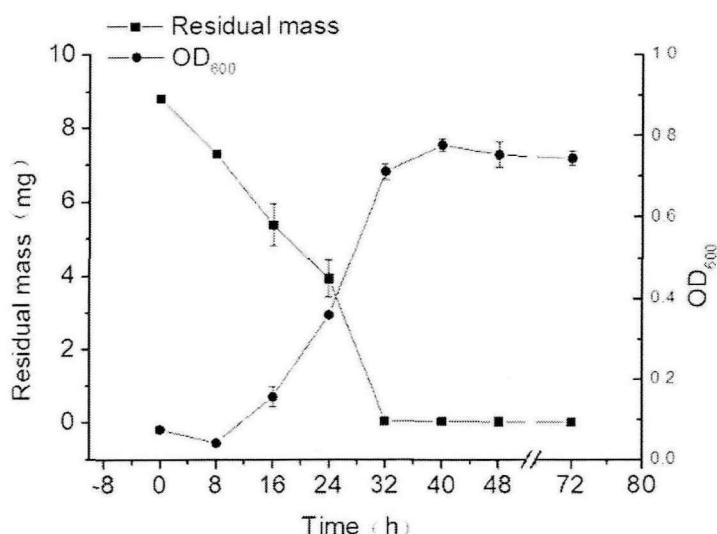


图 3-9 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 在生长过程中对邻二甲苯的利用情况

Fig.3-9 Growth of *Rhodococcus* sp. LEJB-4 upon utilization of o-xylene as the sole carbon source.

如图 3-9 所示，在以邻二甲苯为唯一碳源的培养条件下，每 8 h 测定体系中邻二甲苯的剩余量与菌体的细胞浊度。从第 0 h 开始，菌株 LEJB-4 的细胞浊度首先开始下降，当到达 8 h 时，细胞浊度开始逐渐增加，与此同时，邻二甲苯的剩余量在逐渐减少。表明菌体在 LB 培养基中活化后转移至新的含有邻二甲苯的环境中需要一定的适应期，随后菌体才可以大量增殖。培养第 16 h，细胞生长进入对数期，此时邻二甲苯的降解率为 38.8 %。培养第 40 h，菌株 LEJB-4 的细胞浓度达到最高值，细胞生长进入稳定期，此时培养体系内的邻二甲苯降解效率达到最高，为 99.5 %。当体系内的邻二甲苯基本耗尽，菌体生长开始进入稳定期，细胞浓度不再增加。

陈佩<sup>[80]</sup>等以邻二甲苯为唯一碳源，分离出一株能够降解邻二甲苯的高效菌株 *Pseudomonas* sp. LJ5，在邻二甲苯浓度高达  $2500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时，其去除率在 30 h 内可达到 73%。与上述邻二甲苯降解菌相比，LEJB-4 的降解率更高，但是 LJ5 适用于高浓度的污染物，LEJB-4 适用于低浓度的污染物。在实际的处理 VOCs 的工业应用中，废气的浓度一般较低，因此 LEJB-4 在实际应用中是很有必要的。

在目前报道过的邻二甲苯降解菌中，假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* sp. OX5 在 50 h 内对浓度  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  邻二甲苯的降解率达到 90%<sup>[39]</sup>；动胶菌 *Zoogloea resiniphila* HJ1 在 105 h 内对浓度  $256 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  邻二甲苯的降解率达到 100%<sup>[42]</sup>；假单胞菌

*Pseudomonas putida* F1 在 7.5 h 内对浓度  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  邻二甲苯的降解率达到 80%<sup>[81]</sup>。与上述邻二甲苯降解菌相比，菌株 LEJB-4 的邻二甲苯降解效率处于较高水平。

表 3-3 菌株 LEJB-4 与已报道邻二甲苯降解菌的活性比较

Table 3-3 Comparison of degradation activity between strain LEJB-4 and other reported strains

菌株	参考文献	降解效率
<i>Rhodococcus</i> sp. LEJB-4	This study	$440 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 32h, 99%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> sp. OX5	Pei Chen et al.	$500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 50h, 90%
<i>Zoogloea resiniphila</i> HJ1	Jianming Yu et al.	$256 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 105h, 100%
<i>Pseudomonas putida</i> F1	Robledo-Ortíz et al.	$30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 7.5h, 80%

根据 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 的生长曲线以及邻二甲苯降解速率，将菌株利用邻二甲苯的过程阶段分为四个关键时间节点，即延滞期 ( $T_1 = 0 \text{ h}$ ,  $\text{OD}_{600} = 0.074$ )，对数生长期初期 ( $T_2 = 16 \text{ h}$ ,  $\text{OD}_{600} = 0.155$ )，对数生长期中期 ( $T_3 = 24 \text{ h}$ ,  $\text{OD}_{600} = 0.358$ ) 和稳定期 ( $T_4 = 32 \text{ h}$ ,  $\text{OD}_{600} = 0.711$ )。选择这四个时间点作为后续转录组学研究的样品采集的时间点，以便于后期通过转录组学技术对 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 不同生长阶段相关基因转录水平的变化进行研究。

### 3.4 总 RNA 纯度和完整性检测

在转录组测序实验中，为保证后续实验成功进行，对从样品中提取的 RNA 的质量进行评估和 RNA 是否受到污染进行检测是必要的。为了对本研究所提取的 RNA 是否符合测序要求，使用 Qubit RNA HS Assay Kit 对 RNA 浓度进行测定，实验结果如表 3-4 所示。

表 3-4 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 样品的检测结果

Table 3-4 The analysis of *Rhodococcus* sp. LEJB-4 RNA samples

样品	1-0h	1-16h	1-24h	1-32h	2-0h	2-16h	2-24h	2-32h
ng/ $\mu\text{l}$	220	526	1268	482	418	910	1100	328

通过琼脂糖凝胶电泳和 Agilent 2100 Bioanalyzer 对样品 RNA 的质量进行评估，其结果分别如图 3-10 和 3-11 所示。由图和表可知，本实验制备的 8 个 RNA 样品，经过 QIAGEN RNeasy Mini Kit 纯化和 QIAGEN RNase-Free DNase Set 去除污染后，RNA 纯度较高，未受到 RNA 的蛋白质的污染。电泳图可以看出其条带完整，且无明显拖尾，说明 total RNA 的完整性符合 RNA-Seq 测序及 cDNA 文库构建的要求，可以用于文库构建及测序。

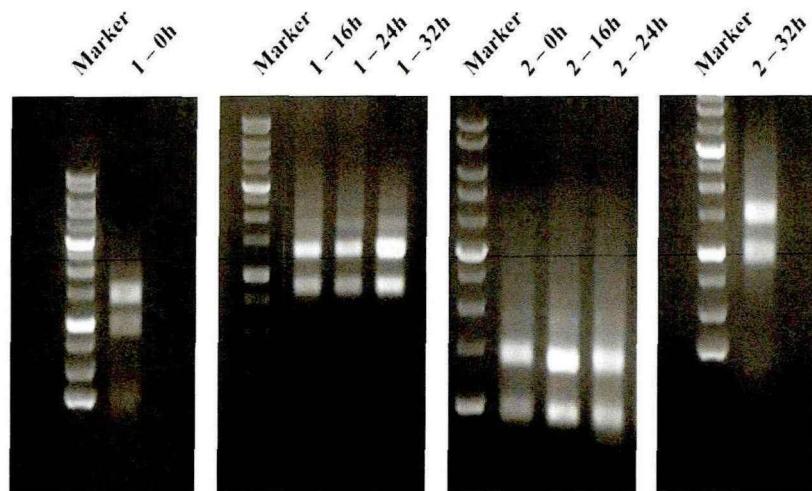


图 3-10 RNA 样品琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3-10 RNA sample agarose gel electrophoresis

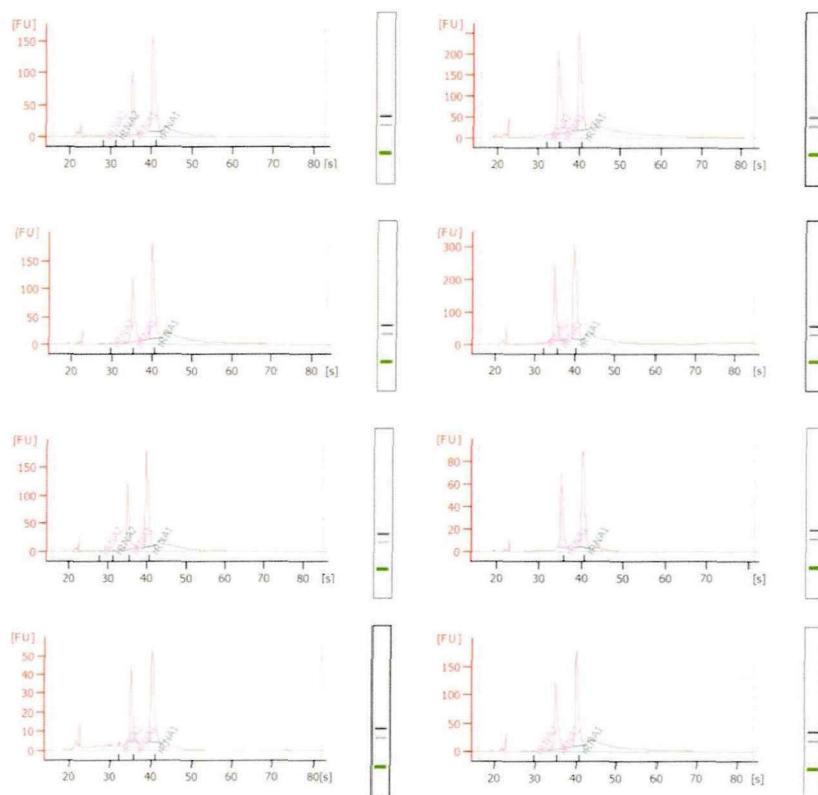


图 3-11 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RNA 样品

Fig. 3-11 Quantitation of RNA samples by Agilent 2100 Bioanalyzer

### 3.5 COG 注释

蛋白质直系同源基因簇 (Clusters of Orthologous Groups, COG) 是对细菌、古细菌和真核生物中 21 种完整基因组编码的蛋白质系统进行分类的一种数据库。它适用

于将新的蛋白加入至 COGs 中，也能够对新测序的基因组进行注释<sup>[82]</sup>。本研究将 Unigene 和 COG 数据库进行比对，对 Unigene 可能的功能进行预测并统计分类，在宏观角度分析菌株 LEJB-4 的基因功能分布。如图 3-12 所示，总共 5239 个 Unigenes 被分为细胞结构、信号转导、新陈代谢等 22 个分类。除去 S (Function unknown) 此项外，在 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 的基因表达谱中，参与转录 (K) 最多，参与 C (能量产生与转化)、E (氨基酸代谢)、G (碳水化合物代谢) 的次之，说明在 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 降解邻二甲苯过程中碳水化合物代谢、氨基酸代谢相关代谢最旺盛。

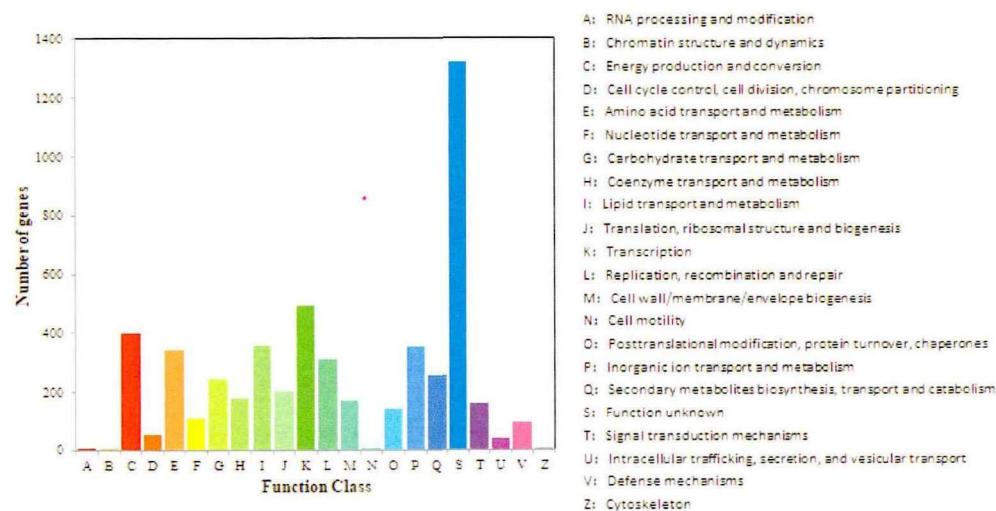


图 3-12 COG 功能注释分类统计图

Fig.3-12 COG function annotation classification statistics

### 3.6 GO 注释

GO (Gene Ontology) 是可以整体阐述基因及其产物属性的一种基因对应功能分类体系，它具有国际标准化和通用化等特点。如图 3-13 所示，GO 由三个 ontology 组成，分别为基因的分子功能 (molecular function)、细胞组分 (cellular component) 和参与的生物过程 (biological process)<sup>[83]</sup>。由于基因表达量是已知的，对于生物过程而言，单基因多被注释为细胞过程和代谢过程。细胞组分大部分主要分配为细胞部分和膜部分。对于分子功能类别，主要包括结合和催化活性。

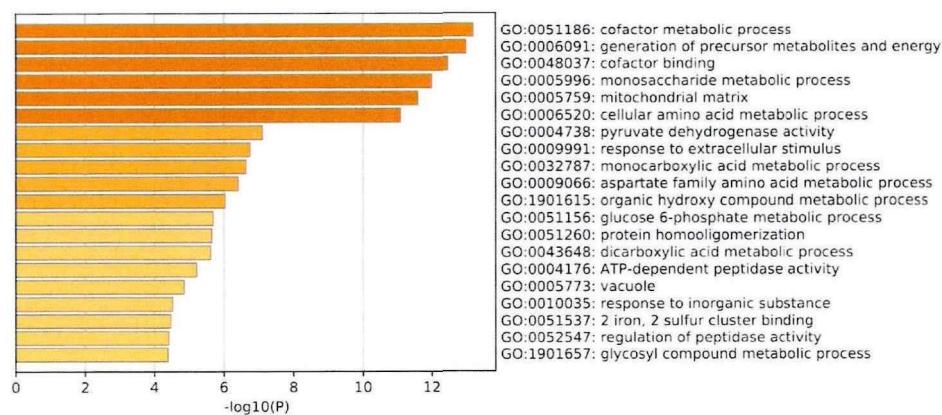


图 3-13 Unigene 的 GO 注释分类图

Fig.3-13 GO annotation classification of Unigene

### 3.7 KEGG 注释

通过 KEGG 数据库进行注释并分析可知, *Rhodococcus* sp. LEJB-4 共有 2262 个 Unigene 共参与了 231 个途径, 其中大多数为细胞内的代谢途径。胞内代谢途径的活跃程度与注释到该代谢途径的 Unigene 数目密切相关, 因此可对在 KEGG 数据库中注释到的通路及其相关的通路按照 Unigene 的数目进行排序, 其排序结果如图 3-14 所示。由图可知, 参与碳水化合物代谢 (Carbohydrate metabolism) 的 Unigene 最多, 达到了 305 个。这与本课题的研究内容基本相吻合。

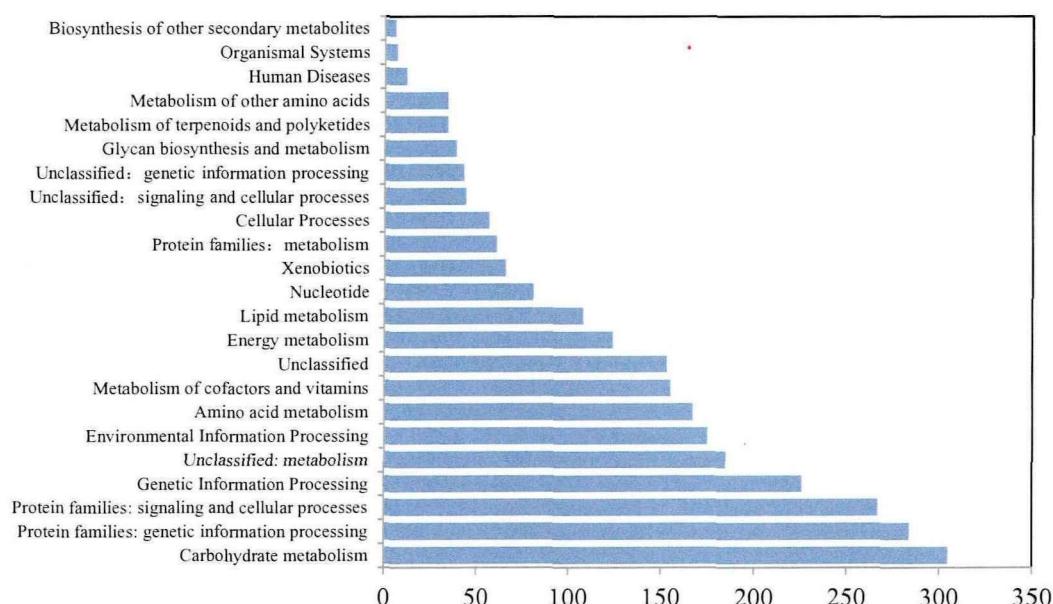


图 3-14 Unigene 的 KEGG 注释分类图

Fig.3-14 KEGG annotation classification of Unigene

### 3.8 差异表达基因分析

为了了解 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 在降解邻二甲苯过程中的 T1、T2、T3 和 T4 时间点差异表达基因情况, Unigene 表达水平用 RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) 表示。四个取样点 (T1~T4) 的两两对比的结果见图 3-15 和 3-16。将 Unigene 分为不同颜色分别表示 RPKM 上调、下调和平, 差异表达条件为  $p\text{-value} \leq 0.05$  和  $|\log_{2}\text{FC}| \geq 1$ 。如图 3-15 所示, 在 T1 与 T2 间的差异表达基因 (DEGs) 中, 共获得 111 个 DEGs, 其中有 69 个被鉴定为表达上调, 有 42 个被鉴定为表达下调。在 T2 与 T3 间的 DEGs 中, 共获得了 81 个 DEGs, 其中有 27 个被鉴定为表达上调, 有 54 个被鉴定为表达下调。在 T3 与 T4 间的 DEGs 中, 共获得了 89 个 DEGs, 其中有 25 个被鉴定为表达上调, 有 64 个基因被鉴定为表达下调。这些差异表达基因的功能

主要包括各类代谢途径、次级代谢物的生物合成和信号传输等。

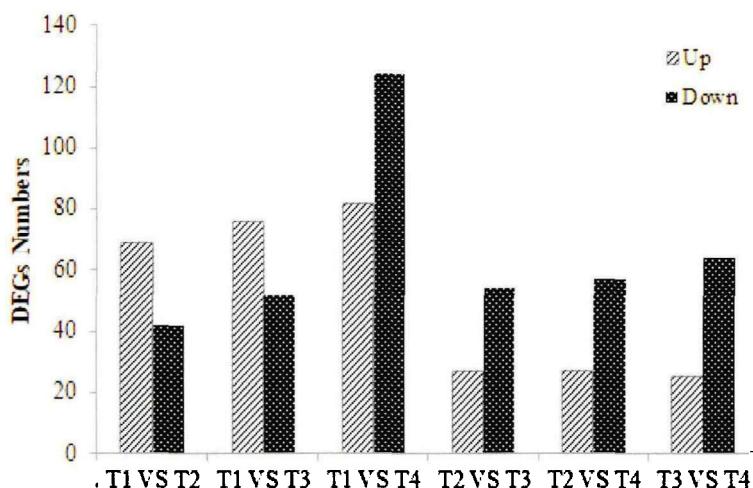


图 3-15 不同时间点差异表达基因统计图

Fig.3-15 Statistics of differentially expressed genes at different time points

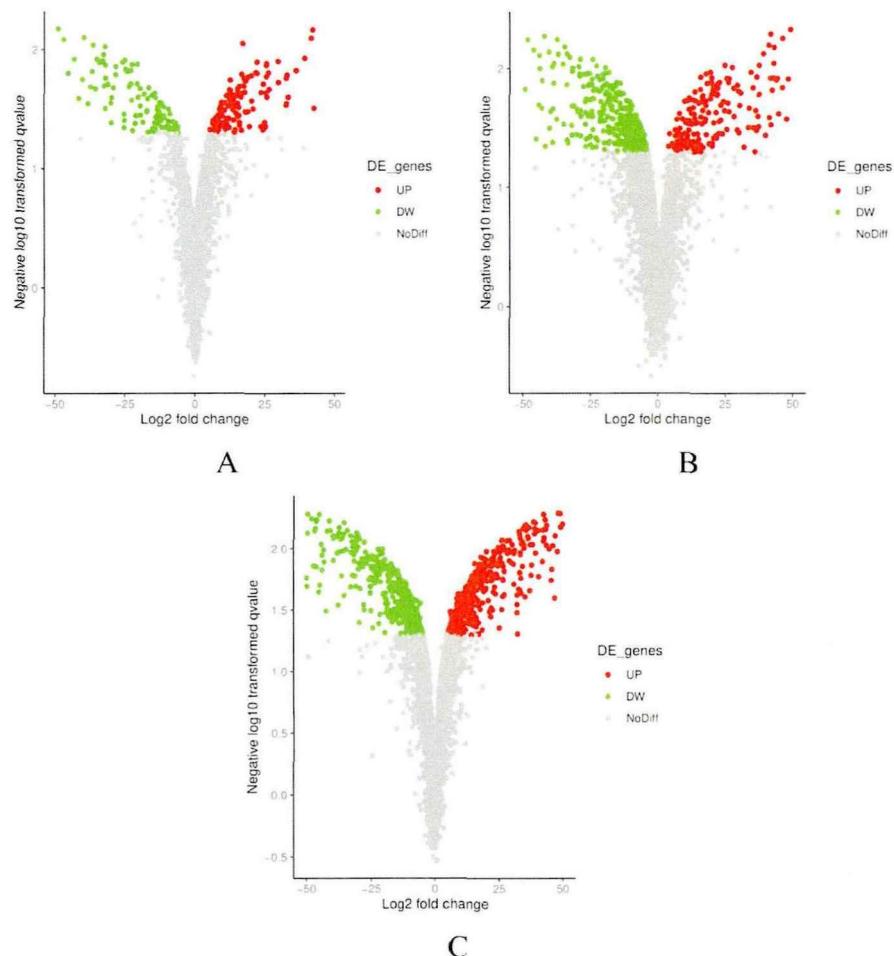


图 3-16 T1 与 T2(A)、T2 与 T3(B)、T3 与 T4(C)的差异表达基因火山图

Fig.3-16 DEG between T1 and T2(A)、T2 and T3(B)、T3 and T4(C)

通过研究发现，不同的基因在 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 的培养过程中的变化趋势是不同的。为了更加直观的研究 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 在 T1、T2、T3 和 T4 过程中基因表达的变化趋势，使用 STEM (Short Time-series Expression Miner) 软件，选择标准化数据模式 (Normalize data) 对两组平行基因表达量 (RPKM) 进行数据处理，基因的表达被分成了 49 个表达趋势图谱，其中有 15 个表达趋势图谱是具有显著性的，分别为 Profile 0、Profile 1、Profile 2、Profile 11、Profile 12、Profile 13、Profile 14、Profile 26、Profile 34、Profile 38、Profile 39、Profile 41、Profile 44、Profile 45 和 Profile 47 (图 3-17)。

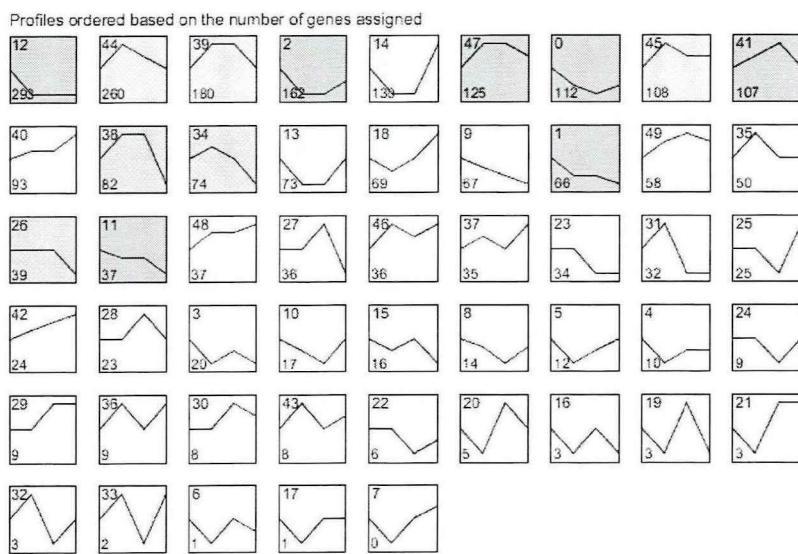


图 3-17 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 基因表达趋势图谱

Fig. 3-17 Expression profile of *Rhodococcus* sp. LEJB-4

图中每一个方格左下角的数字代表基因个数，由图可知，Profile 12 和 Profile 44 所包含的基因数量最多，分别有 293 个和 260 个基因。Profile 12、Profile 0、Profile 1、Profile 2、Profile 26 和 Profile 11 总体处于下调趋势，结果显示 T1 时期基因表达量最高，随着菌体在邻二甲苯环境下生长时间延长，基因表达量较 T1 时期逐渐下降，但其具体还是有差异的，例如 Profile 12 在 T1 时基因表达量最高，从 T1 时期之后表达量开始急剧降低，从 T2 时期开始基因表达都维持较低的表达水平，而 Profile 14 在 T1 至 T3 时期与 Profile 12 保持一致，T3 和 T4 期间的基因表达量有大幅度增加 (图 3-18, A 和 B)。Profile 44、Profile 39、Profile 47、Profile 45、Profile 41、Profile 38 和 Profile 34 的基因表达量都是呈先上升后下降的趋势，但是具体仍有差异，例如 Profile 45 在 T1 和 T2 阶段基因表达量增大，随后有小幅度下降，从 T3 时期开始保持稳定，而 Profile 38 在 T1 和 T2 阶段上升，T2 和 T3 阶段保持稳定不变，T3 和 T4 阶段出现急剧下降 (图 3-18, C 和 D)。同时，其它没有被标记为显著差异的基因表达图谱也值得被关注，例如 Profile 40 和 Profile 42 等基因表达水平持续增加的图谱 (图 3-18, E 和 F)。

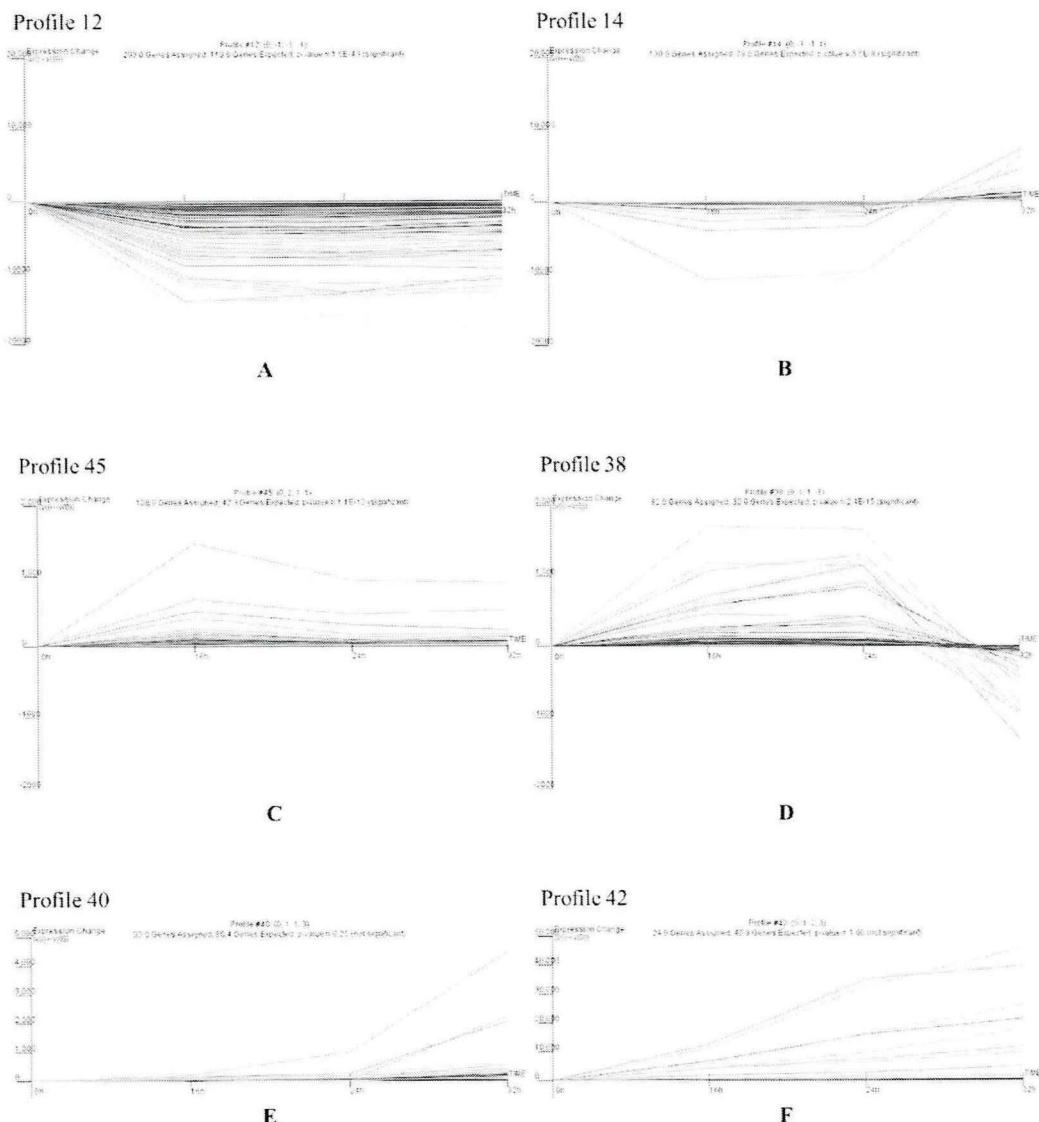


图 3-18 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 基因表达趋势分析

Fig. 3-18 Differential expression analysis of *Rhodococcus* sp. LEJB-4

为了找到菌株 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 降解邻二甲苯过程中起到关键作用的基因，将从分配到 49 个 Profile 的所有基因中进行筛选、查找，为邻二甲苯代谢途径的推测提供理论依据。

### 3.9 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 代谢邻二甲苯过程的差异表达基因分析

首先，通过转录组测序得到菌株 LEJB-4 在转录过程中表达的全部基因，利用 KEGG Automatic Annotation Server (KAAS) 进行 KEGG 自动注释，结果显示这些基因共注释到 231 条途径上。在这些途径中，包含碳代谢、芳香族化合物代谢(map01220)、糖酵解/糖异生 (ko00010)、三羧酸循环 (ko00020) 和蛋白输出 (ko03060) 等细胞生命活动相关的途径，由于本研究是对菌株 LEJB-4 降解邻二甲苯的代谢途径进行研

究，因此首先重点关注二甲苯降解途径（ko00622）（图 3-19）。由图可知，邻二甲苯途径上的大部分酶都已经被注释，但是该途径的第一个酶（EC：1.14.15.26）和第三个酶（EC：1.2.1.7 与 EC：1.2.1.28）均未被注释，经查询后可知，第一个酶为单加氧酶，第三个酶为脱氢酶。因此推测菌株 LEJB-4 的代谢途径与 KEGG 上的参考有所不同，可能存在其它代谢途径代替了单加氧酶的代谢途径。

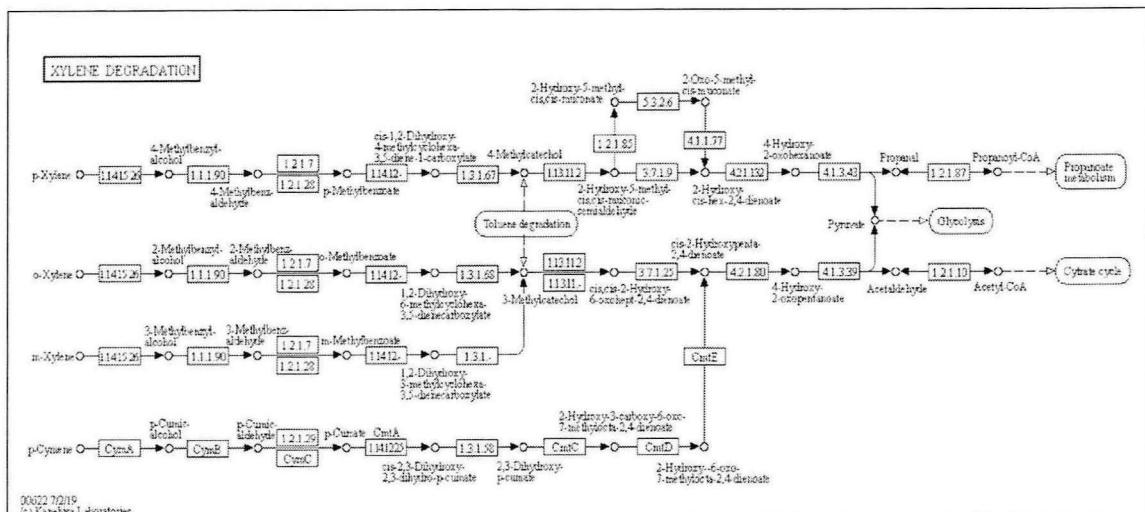


图 3-19 二甲苯降解途径注释结果

Fig.3-19 The annotation results of xylene degradation pathway

此外，有学者曾经对邻二甲苯的代谢途径进行研究，尤其是苯环开环的过程。其中第一条途径是 *Rhodococcus* sp. strain B3 对邻二甲苯的代谢，它首先对邻二甲苯的甲基进行氧化，形成 2-甲基苯甲醇，随后代谢形成 3-甲基邻苯二酚（图 3-20，A）。第二条途径是 *Rhodococcus* sp. strain DK17 对邻二甲苯的代谢，首先通过环羟化 2,3-双加氧酶的作用下，最终形成 3,4-二甲基邻苯二酚（图 3-20，B）。第三条途径是 *P. stutzeri* strain OX1 对邻二甲苯的代谢，首先通过环羟化单加氧酶作用于苯环的 3 号碳或 4 号碳，最终形成 3,4-二甲基邻苯二酚（图 3-20，C1 和 C2）。

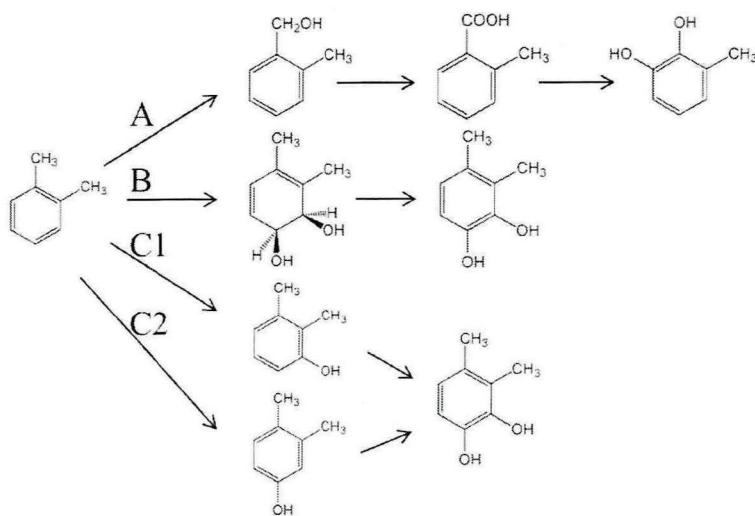


图 3-20 细菌中不同的邻二甲苯代谢途径<sup>[47]</sup>

Fig. 3-20 Overview of different o-xylene degradation pathways in bacteria

由图可知, 邻二甲苯的代谢过程中的关键酶可以是单加氧酶, 也可以是双加氧酶, 因此又可以称为单加氧途径和双加氧途径。通过查找筛选, 由于 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 的转录表达基因中未发现基因表达显著变化的单加氧酶, 因此关注的重点由单加氧途径转为双加氧途径。

在前期的基因注释中, *Rhodococcus* sp. LEJB-4 的转录过程表达的基因已经被注释到各个数据库中, 因此我们可以知道其对应的蛋白及注释的功能。通过查找和筛选, 将所有被注释为双加氧酶功能的基因进行汇总, 但是该类基因数目巨大, 若想找出与邻二甲苯代谢相关的关键基因, 还需要进一步缩小其范围。根据查阅相关文献, Alessandra<sup>[47]</sup>等通过基因组学的方法对菌株 *Rhodococcus opacus* R7 降解邻二甲苯的代谢机制进行研究。研究过程中, 其将菌株 *R. opacus* R7 的潜在双加氧蛋白与参考的双加氧蛋白序列聚类到同一个系统进化树上, 以查看各个双加氧酶间的亲源关系。

本研究即参考此研究方法, 将菌株 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 的潜在双加氧酶蛋白与文献中所有的参考蛋白序列聚类到同一个系统进化树上(图 3-21), 以查找和筛选邻二甲苯代谢过程中相关双加氧酶的基因。

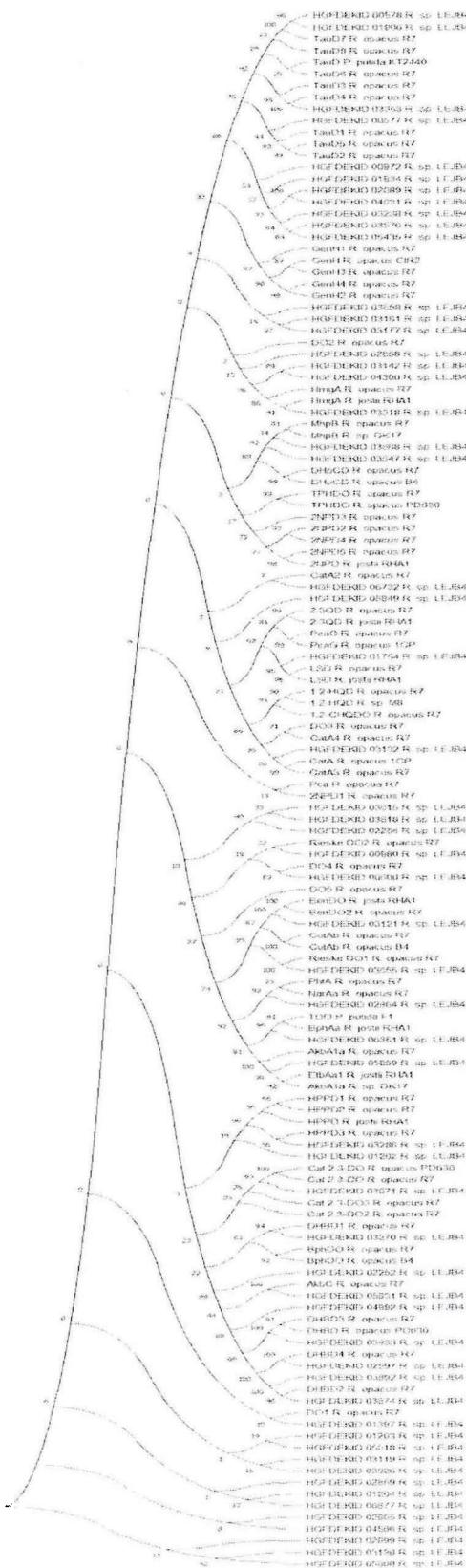


图 3-21 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 的双加氧酶系统进化树

Fig.3-21 Phylogenetic tree of *Rhodococcus* sp. LEJB-4 of dioxygenases

由图可知,发现菌株 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 有一些蛋白序列与参考蛋白序列是非常相似的,具有显著的同源性,例如 HGFDEKID\_01906 与 TauD7、HGFDEKID\_03353 与 TauD4、HGFDEKID\_03132 与 CatA、HGFDEKID\_03121 与 BenDO2、HGFDEKID\_05859 与 AkbA1a 等。由此以来又进一步缩小选择范围,可以对这些蛋白进行下一步研究。可通过观察这些蛋白对应基因的表达水平在 T1~T4 阶段的变化趋势,以判断其是否在降解邻二甲苯的代谢途径中起到关键性作用。

在前期的研究中,通过 STEM 软件将所有的基因表达趋势图谱进行了分类。当菌株 LEJB-4 从 LB 培养基中转接至邻二甲苯无机盐培养基时,菌株进入了一个全新的环境中,菌株为了适应新的环境刺激并且生存下去,必定会有一些关键基因的表达会明显增加。因此,对基因表达值持续上升的图谱 Profile 42(图 3-18, F)的研究显得尤为重要。Profile 42 的基因表如表 3-5 所示。

表 3-5 Profile 42 中各个基因表达量

Table 3-5 Gene Table for Profile 42

Gene ID	T1	T2	T3	T4
HGFDEKID_00058	201.0826058	220.1447667	244.9728086	290.8731158
HGFDEKID_00205	71.56539865	92.29845229	97.69813645	114.9601838
HGFDEKID_00928	82.0608882	121.3286851	139.3962326	163.8833278
HGFDEKID_01079	119.2457905	141.8541188	169.7634664	166.6743241
HGFDEKID_01083	56.86650485	92.43312761	133.4137837	192.9879032
HGFDEKID_01085	102.0420588	133.2865996	266.735221	494.9048951
HGFDEKID_01221	130.2472142	181.3492662	197.7452897	239.09487
HGFDEKID_02355	39.44986162	72.28601439	91.93632317	144.006462
HGFDEKID_02359	56.54844525	81.36288103	94.0830191	122.9692374
HGFDEKID_02973	73.13364502	77.88826405	114.1999037	138.7109067
HGFDEKID_04446	104.3119751	150.6511987	207.8613391	199.84455
HGFDEKID_04482	193.4694566	241.321145	298.5370817	332.7527536
HGFDEKID_04865	101.1000969	194.3639728	307.4340678	514.0212761
HGFDEKID_05178	113.996164	189.5655277	231.2293368	284.5853396
HGFDEKID_05677	591.0068876	4561.175652	9973.701663	18164.77672
HGFDEKID_05759	89.05857582	1848.947342	2693.854246	4664.335182
HGFDEKID_05760	132.5116962	653.8719157	786.5286285	1272.563355
HGFDEKID_05777	78.33076604	701.7805219	1441.607956	1846.968781
HGFDEKID_05784	157.7599122	4058.102867	7382.879224	11550.20621
HGFDEKID_05785	168.553518	4172.266934	6373.526831	9533.531403
HGFDEKID_05848	160.3235888	6696.068891	15854.03207	21466.28034
HGFDEKID_05849	106.1204879	5562.36203	16036.67097	25970.59541

HGFDEKID_05859	358.7689862	11420.41724	32832.93664	45841.41925
HGFDEKID_05860	342.0359401	12734.62922	35241.20589	39729.58317

由表可知, 菌株 LEJB-4 在邻二甲苯环境的生长过程中, 共有 24 个基因表达从 T1 至 T4 呈持续增高。其中, 有些基因的基因表达变化较为明显, 例如 HGFDEKID\_05860, T2、T3、T4 与 T1 相比分别上调了 37.23 倍、103.03 倍、116.16 倍。相比之下, 另一些基因表达变化并不明显。所以, 将这些基因中筛选出 10 个进行后续研究, 其中包括 HGFDEKID\_05677、HGFDEKID\_05759、HGFDEKID\_05760、HGFDEKID\_05777、HGFDEKID\_05784、HGFDEKID\_05785、HGFDEKID\_05848、HGFDEKID\_05849、HGFDEKID\_05859 和 HGFDEKID\_05860。通过 10 个基因的序列进行功能注释, 其结果如表 3-6 所示。

表 3-6 菌株 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 持续上调基因的注释

Table 3-6 The annotation of up-regulated gene of *Rhodococcus* sp. LEJB-4

Gene ID	gene	EC_number	product
HGFDEKID_05677	-	-	hypothetical protein
HGFDEKID_05759	-	-	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase
HGFDEKID_05760	nreC_4	-	Oxygen regulatory protein NreC
HGFDEKID_05777	-	-	hypothetical protein
HGFDEKID_05784	bphB_2	1.3.1.56	Cis-2,3-dihydrobiphenyl-2,3-diol dehydrogenase
HGFDEKID_05785	thcD_4	1.18.1.-	Rhodocoxin reductase
HGFDEKID_05848	xylF_4	3.7.1.9	2-hydroxymuconate semialdehyde hydrolase
HGFDEKID_05849	andAb	-	Anthranilate 1,2-dioxygenase ferredoxin subunit
HGFDEKID_05859	bnzA	1.14.12.3	Benzene 1,2-dioxygenase subunit alpha
HGFDEKID_05860	bedC2	1.14.12.3	Benzene 1,2-dioxygenase subunit beta

由表 3-5 可知, 基因 HGFDEKID\_05859 和 HGFDEKID\_05860 被注释为苯 1,2-双加氧酶的亚基, 且基因表达上调倍数显著, 推测其与邻二甲苯的代谢密切相关, 表明在菌株 LEJB-4 在邻二甲苯环境中培养时, 胞内合成双加氧酶以参与邻二甲苯的代谢途径。

与此同时, 由双加氧酶的系统进化树图可知, 基因 HGFDEKID\_05859 与 *AkbA1a R. opacus* R7 的同源性最近, 而且, 通过 Alessandra<sup>[47]</sup>等研究表明, *R. opacus* R7 的 *akbA1* 正是邻二甲苯双加氧过程中起作用的关键酶(图 3-22)。

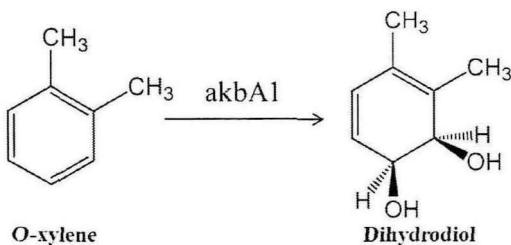


图 3-22 邻二甲苯降解的起始步骤

Fig.3-22 Initial step of o-xylene degradation

由于在基因表达分析过程中未发现相关单加氧酶，但是发现了双加氧酶的相关基因 HGFDEKID\_05859，且基因表达量在 T2、T3、T4 时与 T1 相比分别上调了 31.83 倍、91.52 倍、127.77 倍。因此，菌株 LEJB-4 降解邻二甲苯的代谢途径为双加氧酶途径，基因 HGFDEKID\_05859 被认为是邻二甲苯开环过程的关键基因并发挥重要作用，使邻二甲苯经过双加氧形成邻二甲苯顺式-3,4-二氢二醇。

生成邻二甲苯顺式-3,4-二氢二醇后，由于邻二甲苯顺式-3,4-二氢二醇是一种非常不稳定的混合物，易脱水，经过脱氢酶脱氢形成3,4-二甲基邻苯二酚<sup>[46]</sup>。由表3-5可知，基因HGFDEKID\_05784是唯一一个基因表达持续上调的脱氢酶，基因表达量在T2、T3、T4时与T1相比分别上调了25.72倍、46.8倍、73.21倍。通过KEGG查询可知，顺式-2,3-二氢联苯-2,3-二醇脱氢酶具有从苯环上脱氢的功能。因此，基因HGFDEKID\_05784被认为是邻二甲苯代谢过程中的关键基因，使顺式-3,4-二氢二醇形成3,4-二甲基邻苯二酚。

当生成 3,4-二甲基邻苯二酚后，代谢即进入邻苯二酚途径，3,4-二甲基邻苯二酚仍需要加氧酶来进行开环，经过对双加氧酶系统进化树（图 3-21）进行查找筛选，HGFDEKID\_05831 与 *R. opacus* R7 的 AkbC 具有显著的同源性，同时 AkbC 是具有环裂解功能的双加氧酶，因此 HGFDEKID\_05831 被认为是与 3,4-二甲基邻苯二酚开环的相关基因。HGFDEKID\_05831 属于基因表达图谱中的 Profile 49，其基因表达水平在 T2、T3、T4 时与 T1 相比分别上调了 46.66 倍、87.29 倍、63.88 倍，在 T1 和 T3 之间是明显升高的，T3~T4 之间稍有下降，但仍保持较高表达水平（表 3-7）。经过 KEGG 查询，发现此双加氧酶具有从苯环相邻的两个羟基之间开环的功能，因此，HGFDEKID\_05831 被认为是邻二甲苯代谢过程中的关键基因，使 3,4-二甲基邻苯二酚形成 2-羟基-5-甲基-6 氧代-庚-2,4-二烯酸脂。

表 3-7 基因 HGFDEKID 05831 的表达量

Table 3-7 Gene expression of HGFDEKID 05831

Gene ID	T1	T2	T3	T4
HGFDEKID_05831	235.831177	11003.74453	20586.69429	15064.64003

综上所述, 菌株 LEJB-4 降解邻二甲苯的代谢途径为双加氧途径, 其代谢产物依

次为邻二甲苯、邻二甲苯顺式-3,4-二氢二醇、3,4-二甲基邻苯二酚和 2-羟基-5-甲基-6-氧代-庚-2,4-二烯酸脂，如图 3-23 所示。

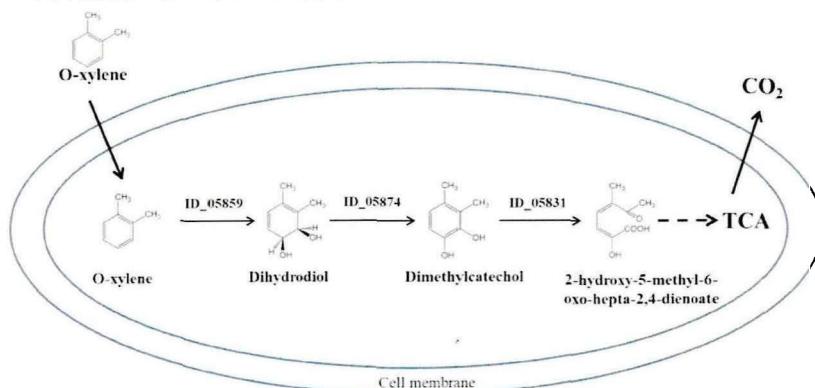
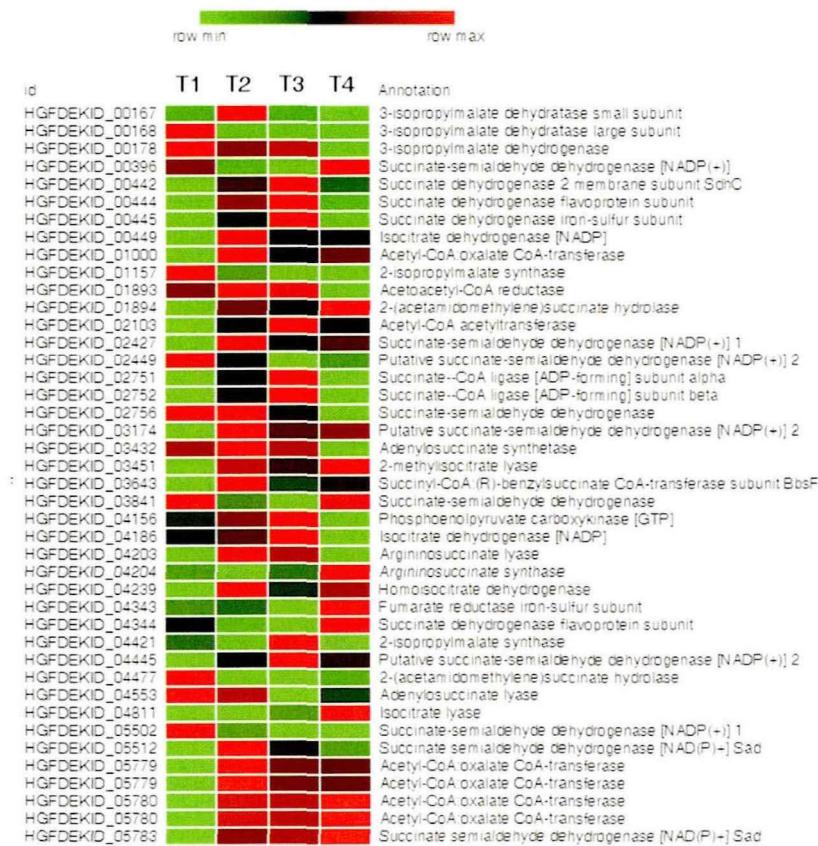


图 3-23 推测的邻二甲苯代谢途径

Fig. 3-23 Speculated metabolic pathway of o-xylene

### 3.10 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 TCA 途径的差异表达基因分析

TCA 途径即柠檬酸途径，又称为三羧酸途径，是脂类、糖类和氨基酸的末端代谢通路，同时也是细胞产生能量的途径之一<sup>[84]</sup>。本试验通过对菌株 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 进行转录组测序，从转录水平检测到 TCA 循环相关蛋白基因 42 个，包括 HGFDEKID\_05783（琥珀酸半醛脱氢酶）、HGFDEKID\_05779（乙酰辅酶 A：草酸辅酶 A 转移酶）、HGFDEKID\_04811（异柠檬酸裂合酶）和 HGFDEKID\_01893（乙酰乙酰辅酶 A 还原酶）等，其基因表达热图如图 3-24 所示。

图 3-24 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 TCA 途径相关蛋白基因表达量热图Fig.3-24 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 TCA pathway related protein gene expression heatmap

由图可知,当 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 在邻二甲苯培养基中生长时, T2、T3 时期与 T1 时期相比,大多数基因表达水平显著上调,少数基因出现下调。其中基因表达水平显著的基因包括 HGFDEKID\_01893(乙酰乙酰辅酶 A 还原酶)、HGFDEKID\_02752(琥珀酸-CoA 连接酶 β 亚基)、HGFDEKID\_04811(异柠檬酸裂合酶)、HGFDEKID\_05780(乙酰辅酶 A: 草酸辅酶 A 转移酶)和 HGFDEKID\_05783(琥珀酸半醛脱氢酶),如表 3-8 所示。这些酶均参与了 TCA 途径及其相关途径,发挥重要功能。由表可知,5 个基因在表达过程中含有共同特点,即 T2 时期的基因表达值均高于 T1 时期,5 个基因在 T2 时期与 T1 时期相比较依次分别上调了 1.41 倍、4.88 倍、1.13 倍、43 倍和 29.45 倍,说明在 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 的 TCA 途径相关基因在 T1 时期表达水平较低,从 T2 时期开始显著增高。

表 3-8 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 TCA 途径关键基因表达变化Table 3-8 TCA pathway key gene expression changes of *Rhodococcus* sp. LEJB-4

Gene ID	T1	T2	T3	T4
HGFDEKID_01893	1096.872232	1545.875997	1497.642853	166.6824538
HGFDEKID_02752	258.6445326	1261.813151	2061.100202	297.3814785

HGFDEKID_04811	1463.408413	1646.554182	2463.308628	5911.943062
HGFDEKID_05780	31.85843112	1369.99051	1265.311643	1574.330833
HGFDEKID_05783	147.1585898	4333.541253	4947.463947	6356.514231

由于 T1 和 T2 分别为菌株 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 在邻二甲苯培养基中生长 0 h 和 16 h, 因此菌株在 T1 时期未接触邻二甲苯, 在 T2 时期已经接触邻二甲苯, 表明邻二甲苯对于菌株 LEJB-4 的 TCA 途径具有显著影响。根据 Kim<sup>[46]</sup> 等研究发现, 邻二甲苯在细胞中进行代谢后, 最终进入 TCA 途径作为最终反应途径, 生成 CO<sub>2</sub>。综上所述, 菌株 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 的邻二甲苯代谢机制对 TCA 途径具有显著的调控作用, 使邻二甲苯或其代谢产物能够被彻底分解并产生能量供细胞使用, 维持细胞的稳定。

### 3.11 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 细胞壁和细胞膜相关蛋白基因

在革兰氏阳性细菌中, 细胞壁是重要组成成分之一, 同时也在菌体生长繁殖的过程中发挥重要作用<sup>[85]</sup>, 其中包括保护细胞的完整性、抵御胞外环境刺激对细胞所产生的影响等。革兰氏阳性菌主要由肽聚糖和磷壁酸组成, 与细胞膜构成细胞外部结构<sup>[86]</sup>。因此, 本试验通过对菌株 LEJB-4 进行转录组测序, 从转录水平检测到细胞壁相关蛋白基因 13 个, 其基因表达热图如图 3-25 所示。

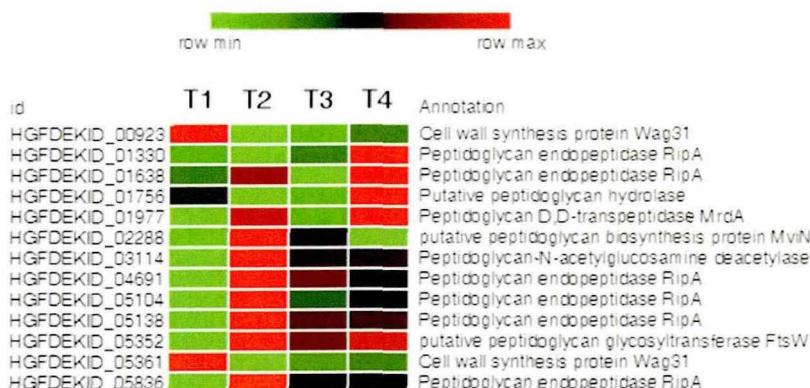


图 3-25 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 细胞壁相关蛋白基因表达量热图

Fig. 3-25 Calorimetry of cell wall-related protein gene expression in *Rhodococcus* sp. LEJB-4 cells

由结果可知, *Rhodococcus* sp. LEJB-4 在邻二甲苯环境条件下生长, T1 时期细胞壁合成蛋白基因大量表达, 当 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 生长进入对数期 T2 后, 大量的肽聚糖相关基因开始表达。由表 3-9 可知, 其中细胞壁合成蛋白基因 HGFDEKID\_00923 和 HGFDEKID\_05361 在 T2 时期与 T1 相比分别下调了 2.39 倍和 2.17 倍, T4 时期与 T2 时期相比分别上调了 1.41 倍和 1.33 倍, 然而肽聚糖相关蛋白基因 HGFDEKID\_01330 和 HGFDEKID\_01756 的表达水平从 T3 时期出现明显上调, 当菌株生长至 T4 时期, 其表达水平分别为 T3 时期的 2.09 倍和 3.00 倍。同时与上述基因表达水平不同的是, 还有一部分肽聚糖相关蛋白基因在 T2 时期较 T1 明显上调, 随后出现下调的趋势。推测在邻二甲苯环境下菌株 LEJB-4 的细胞壁成分与结构发生改变。

表 3-9 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 细胞壁关键基因表达变化Table 3-9 Cell wall key gene expression changes of *Rhodococcus* sp. LEJB-4

Gene ID	T1	T2	T3	T4
HGFDEKID_00923	882.1696549	368.7140663	427.4890468	518.8764132
HGFDEKID_01330	389.1654151	289.2254659	516.4193235	1079.998123
HGFDEKID_01756	326.9941821	140.7185498	187.9316448	563.8019474
HGFDEKID_05361	1588.327021	730.5338944	920.2776165	968.5978541

综上所述，当 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 在 T1 时期未受到邻二甲苯刺激时，细胞壁合成蛋白基因表达水平较高，而肽聚糖相关蛋白基因表达水平较低。菌株 LEJB-4 生长至 T2 时，细胞壁合成蛋白基因表达水平均明显下调，而大部分肽聚糖相关蛋白基因表达水平明显上调。由此可知，由于菌株 LEJB-4 在培养时首先在 LB 培养基中进行活化，待其生长至对数期转接至以邻二甲苯为唯一碳源的无机盐培养基中，因此在 T1 时期菌体仍处于快速增殖期，细胞分裂活跃。随着生长环境以及碳源的改变，菌体需要经过一段适应期才能快速代谢邻二甲苯，所以菌体 LEJB-4 的细胞壁合成蛋白基因在 T2 时期较 T1 时期明显下降。与此同时，大部分肽聚糖相关蛋白基因上调，表明肽聚糖生物合成并且为后期菌体生长和分裂所需合成细胞壁做准备。

因此，*Rhodococcus* sp. LEJB-4 在邻二甲苯无机盐培养基中生长并代谢邻二甲苯的过程中，为了使细胞壁维持稳定，邻二甲苯通过对菌株的转录水平进行上调或下调，以实现不同程度的抑制或促进作用，维持细胞稳定，使其可以快速高效的降解邻二甲苯。

细胞膜是构成细胞的重要组成部分，其主要功能包括控制物质进出、信息交流和分泌运输蛋白等，可以使细胞维持稳定的胞内代谢环境<sup>[87]</sup>。从转录组水平来看，本试验共检测到 40 个细胞膜相关蛋白基因，其结果如图 3-26 所示。由图可知，大部分细胞膜相关蛋白基因在 T1 时期的基因表达水平较低，T2 时期较 T1 时期明显上调，但也有少部分在 T1 时期基因表达水平较高，T2 时期较 T1 时期明显下调。

在邻二甲苯代谢过程中，*Rhodococcus* sp. LEJB-4 在含邻二甲苯的无机盐培养基中生长，降解邻二甲苯的首要步骤就是通过细胞膜将邻二甲苯转移至胞内，随后再通过胞内的代谢反应将邻二甲苯作为碳源降解利用，产生能量以供自身生长和增殖。在 T1 时期，菌株 LEJB-4 未接触到邻二甲苯，因此大部分细胞膜相关蛋白基因表达水平较低，当到达 T2 时期，基因表达水平明显提高，使得细胞膜组分和通透性产生变化。结合菌株 LEJB-4 在邻二甲苯无机盐培养基中的生长曲线进行分析，发现菌体的生长速率显著提高，表明邻二甲苯进入细胞内并被降解利用，与细胞膜相关蛋白基因的表达水平结论相一致。此外，通过菌株 LEJB-4 分别在 LB 培养基和邻二甲苯无机盐培养基中生长的透射电镜照片（图 3-6，C 和 G），可以明显的发现后者的细胞内含有大分子物质，推测为邻二甲苯或其代谢产物，表明细胞膜在邻二甲苯代谢过程中发挥重要作用。

综上所述, *Rhodococcus* sp. LEJB-4 的邻二甲苯代谢机制对细胞膜相关蛋白基因具有明显的调控作用。当菌株在邻二甲苯为唯一碳源的环境下, 通过对细胞膜相关蛋白基因的调控, 使其转录水平相应的上调或下调。邻二甲苯通过细胞膜进入胞内, 被降解利用、产生能量, 以供细胞的生长和增殖。



图 3-26 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 细胞膜相关蛋白基因表达量热图

Fig. 3-26 Calorimetry of membrane-associated protein gene expression in *Rhodococcus* sp. LEJB-4 cells

## 4 结 论

### 4.1 全文总结

本论文以邻二甲苯为唯一碳源，从二甲苯生物滴滤降解反应器的生物膜菌群中筛选出一株高效邻二甲苯降解菌，对其基本特性、最适生长条件、降解效率和邻二甲苯代谢的分子机制进行研究，主要得出以下结论：

(1) 通过“LB 培养基富集、无机盐培养基初筛、无机盐平板复筛”的方法，快速筛选出 7 株邻二甲苯降解菌。其中菌株 LEJB-4 的降解效率最高，其菌落形态呈不规则形，表面干燥粗糙，细胞形态呈杆状。16s rDNA 测序比对后，显示菌株 LEJB-4 为红球菌属。

(2) 温度、pH 等因素影响微生物细胞内的多种生理生化反应。研究发现，菌株 *Rhodococcus* sp. LEJB-4 最适生长温度为 30 °C，最适 pH 为 7，其不仅可以邻二甲苯为唯一碳源进行生长，而且也可以苯、甲苯作为唯一碳源。在最适生长条件下，菌株 LEJB-4 在 32 h 内对初始浓度为 440 mg•L<sup>-1</sup> 邻二甲苯的降解效率达到 99 %。

(3) 通过转录组测序的方法，对菌株 LEJB-4 在邻二甲苯培养基中生长的不同时间点的菌体进行测序，经过分析得到了邻二甲苯的代谢途径：邻二甲苯在双加氧酶的作用下形成邻二甲苯顺式二氢二醇，随后邻二甲苯顺式二氢二醇脱氢形成二甲基邻苯二酚，再经过双加氧酶的作用下开环生成 2-羟基-5-甲基-6 氧代-庚-2,4-二烯酸脂，最后进入 TCA 途径生成 CO<sub>2</sub>。

(4) 菌株 LEJB-4 的邻二甲苯代谢机制对细胞壁、细胞膜相关蛋白基因和 TCA 途径具有明显的调控作用。

### 4.2 论文的创新点

(1) 通过快速筛选的方法，获得了一株可以在较短时间内及高效降解邻二甲苯的细菌。

(2) 对菌株的最适生长条件和底物广谱性进行详细研究，为菌株在后期的工业应用中提供参考。

(3) 通过转录组测序的方法，对菌株 LEJB-4 在不同时间点的菌体进行测序分析，能够更直观的得出菌体在降解邻二甲苯过程中的规律，为阐明邻二甲苯的分子代谢机制奠定了研究基础。

### 4.3 论文的不足之处

由于实验时间以及个人能力等客观条件因素的限制，本论文所进行的研究相对较为浅显，有些内容研究的并不全面。

(1) 对于邻二甲苯代谢机制的研究，目前只通过转录组结果推测出菌株 LEJB-4 降解邻二甲苯的相关分子机制，缺少代谢组学检测产物结果以验证结论。

(2) 本研究只对菌株 LEJB-4 进行了基本的实验研究，未将其应用到中试或大规

模的应用中。

(3) 菌株 LEJB-4 的邻二甲苯代谢途径一定会对胞内的其它代谢途径和生化反应产生影响, 本研究只对细胞壁、细胞膜和 TCA 途径的影响进行了初步探究, 仍未阐明细胞的整体调控机制。

## 5 展望

由于生物降解邻二甲苯涉及到细胞内多个生物降解过程，它们之间相互联系和影响，并且影响因素较为复杂，目前仍然缺乏实验证据来深入分析。同时，对于菌株的实际工业应用也未能实现。因此，对以下几个研究方向进行展望。

- (1) 对邻二甲苯代谢过程的中间代谢产物进行检测。同时可以利用中间代谢产物作为碳源，监测菌株的生长状况，为邻二甲苯代谢途径的研究提供直接的理论依据。
- (2) 进一步探究菌株 LEJB-4 降解邻二甲苯过程的分子机制，以及与胞内其它代谢途径间的联系，阐明邻二甲苯代谢机制与其它代谢间的关系。
- (3) 将菌株 LEJB-4 应用至中试或工业中，通过监测调试，优化条件，使其实现工业化应用。

## 6 参考文献

- [1] 王海林, 张国宁, 聂磊, 等. 我国工业 VOCs 减排控制与管理对策研究[J]. 环境科学, 2011, 32(12): 5-11.
- [2] 刘志军, 黄艳芳, 刘金红. 活性炭吸附法脱除 VOCs 的研究进展[J]. 天然气化工, 2014, 039(2): 75-79.
- [3] 王铁宇, 李奇锋, 吕永龙. 我国 VOCs 的排放特征及控制对策研究[J]. 环境科学, 2013, 12(12): 4756-4763.
- [4] Dawson H E, Mcalary T. A Compilation Of Statistics For Voc From Post-1990 Indoor Air Concentration Studies In North American Residences Unaffected By Subsurfacevapor Intrusion[J]. Ground Water Monitoring & Remediation, 2009, 29(1): 60-69.
- [5] 张劲. 环境空气中 VOCs 的来源和特征的研究[J]. 山东工业技术, 2017(19): 228.
- [6] 席劲瑛, 武俊良, 胡洪营, 等. 工业 VOCs 气体处理技术应用状况调查分析[J]. 中国环境科学, 2012, 32(11): 1955-1960.
- [7] 苏雷燕, 李岩, 赵明. 环境空气中挥发性有机物(VOCs)来源解析的研究进展[J]. 绿色科技, 2013(5): 168-171.
- [8] Guenther A, Hewitt C N, Erickson D, et al. A global model of natural volatile organic compound emissions[J]. Journal of Geophysical Research, 1995, 100(D5): 8873-8892.
- [9] Hailin W, Lie N, Jing L, et al. Characterization and assessment of volatile organic compounds (VOCs) emissions from typical industries[J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(7): 724-730.
- [10] 孙珮石, 李晓梅, 孙悦, 等. 气液相组合生物法净化低浓度甲醛废气研究[J]. 环境工程学报, 2007, 1(5): 71-75.
- [11] 徐奕菲, 何磊, 刘冬梅, 等. 二甲苯等 VOCs 类有毒空气污染物重点防控行业分析与优先控制政策[J]. 环境与发展, 2013, 25(9): 98-101.
- [12] 杨新兴, 李世莲, 尉鹏, 等. 环境中的 VOCs 及其危害[J]. 前沿科学, 2013, 7(04): 23-37.
- [13] 温志刚, 张桂华. 挥发性有机物治理技术进展[J]. 煤炭与化工, 2016, 039(8): 11-14.
- [14] 吴祖良, 谢德援, 陆豪, 等. 挥发性有机物处理新技术的研究[J]. 环境工程学报, 2012, 30(3): 76-80.
- [15] 熊振华, 钱枫, 苏荣荣. 大气中 VOCs 分布特征和来源的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2013, 36(12M): 222-228.
- [16] Zhang X, Gao B, Creamer A E, et al. Adsorption of VOCs onto engineered carbon materials: A review[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 338(sep.15): 102-123.
- [17] 赵恒. 挥发性有机物治理技术研究进展[J]. 石油化工, 2019, 48(03): 318-325.

- [18] Jorio H, Kiared K, Brzezinski R, et al. Treatment of air polluted with high concentrations of toluene and xylene in a pilot-scale biofilter[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1998, 73(3): 183-196.
- [19] 张明星. 活性炭吸附法在挥发性有机物治理中的应用研究[J]. 化工管理, 2018, No.495(24): 49.
- [20] Yi F Y, Lin X D, Chen S X, et al. Adsorption of VOC on modified activated carbon fiber[J]. Journal of Porous Materials, 2009, 16(5): 521-526.
- [21] 赵扬, 何璐红, 刘斌杰. 吸收法处理 VOCs 工业废气的研究进展[J]. 山东化工, 2014, 43(5): 78-79.
- [22] 殷冬媛. VOCs 控制与处理技术综述[J]. 化工管理, 2018, 491(20): 154-155.
- [23] Lichtin N N, Sadeghi M. Oxidative photocatalytic degradation of benzene vapor over TiO<sub>2</sub>[J]. Journal of Photochemistry Photobiology A Chemistry, 1998, 113(1): 81-88.
- [24] 王艳芳, 沙昊雷, 於建明. 低浓度 VOCs 废气处理技术进展[J]. 能源环境保护, 2007, 021(003): 8-12.
- [25] 张月萍, 赵平, 焦运伏, 等. 膜分离技术及其在发酵液后处理中的应用[J]. 河北科技大学学报, 2002, 23(3): 24-29.
- [26] Huang L, Nakajo K, Ozawa S, et al. Decomposition of Dichloromethane in a Wire-in-Tube Pulsed Corona Reactor[J]. Environmental Science Technology, 2001, 35(6): 1276-1281.
- [27] 樊青娟, 杨卫红, 鲍若峪, 等. 生物过滤法净化低浓度 VOCs 废气的研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(6C): 12-14.
- [28] Attaway H, Gooding C H, Schmidt M G. Comparison of microporous and nonporous membrane bioreactor systems for the treatment of BTEX in vapor streams[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2002, 28(1): 245-251.
- [29] Hodge D S, Devinny J S. Biofilter Treatment of Ethanol Vapors[J]. Environmental Progress Sustainable Energy, 1994, 13(3): 167-173.
- [30] Corsi R L, Seed L. Biofiltration of BTEX: Media, Substrate, and Loading Effects[J]. Environmental Progress Sustainable Energy, 1995, 14(3): 151-158.
- [31] Xu Z, Mulchandani A, Chen W. Detection of Benzene, Toluene, Ethyl Benzene, and Xylenes (BTEX) Using Toluene Dioxygenase-Peroxidase Coupling Reactions[J]. Biotechnology Progress, 2003, 19(6): 1812-1815.
- [32] Jeong E, Hirai M, Shoda M. Removal of o-xylene using biofilter inoculated with Rhodococcus sp. BTO62[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 152(1): 140-147.
- [33] 周学霞, 姚伟国, 杨冰雪, 等. 生物滴滤塔处理邻二甲苯废气研究[J]. 浙江大学学报(理学版), 2013, 40(1): 75-79.
- [34] Bickerdik S R, Holt R A, Stephens G M. Evidence for metabolism of o-xylene by

- simultaneous ring and methyl group oxidation in a new soil isolate [J]. *Microbiology*, 1997, 143(1): 2321-2329.
- [35] Gennaro PD, Rescalli E, Galli E, et al. Characterization of *Rhodococcus opacus* R7, a strain able to degrade naphthalene and o-xylene isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil[J]. *Res Microbiol*, 2001, 152(01): 641-651.
- [36] Kim D, Chae J C, Jang J Y, et al. Functional characterization and molecular modeling of methylcatechol 2,3-dioxygenase from o-xylene-degrading *Rhodococcus* sp. strain DK17[J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2005, 326(4): 880-886.
- [37] Kim D, Kim Y S, Kim S K, et al. Monocyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2002, 68(7): 3270-3278.
- [38] Higson F K, Focht D D. Degradation of 2-methylbenzoic acid by *Pseudomonas cepacia* MB2[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(5): 1795.
- [39] 陈佩. 邻二甲苯优势菌的分离及其对焦化废水的生物强化研究[D]. 武汉: 武汉科技大学, 2015.
- [40] Sun Y, Xue S, Li L, et al. Sulfur dioxide and o-xylene co-treatment in biofilter: Performance, bacterial populations and bioaerosols emissions[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2018, 69: 41-51.
- [41] 杨卫兵, 朱润晔, 张丽丽, 等. 1株BTEX降解新菌株的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 环境科学, 2010, 31(3): 821-827.
- [42] Yu J, Liu Q, Hu J, et al. Degradation of o-xylene by a novel strain, *Zoogloea resiniphila* HJ1: Identification, kinetics and metabolic pathway[J]. *Global NEST Journal*, 2017, 19(2): 241-250.
- [43] Eulsaeng C, Maaliw G M, Ariz L, et al. Ethylbenzene, o-Xylene, and BTEX Removal by *Sphingomonas* sp. D3K1 in Rock Wool-Compost Biofilters[J]. *Environmental Engineering Science*, 2009, 26(1): 45-52.
- [44] Suzuki M, Hayakawa, T, Shaw J P, et al. Primary structure of xylene monooxygenase: Similarities to and differences from the alkane hydroxylation system[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(5): 1690-1695.
- [45] Benjamin R C, Voss J A, Kunz D A. Nucleotide sequence of *xyIE* from the TOL pDK1 plasmid and structural comparison with isofunctional catechol-2,3-dioxygenase genes from TOL, pWW0 and NAH7[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(8): 2724-2728.
- [46] Kim D, Chae J C, Zylstra G J, et al. Identification of a Novel Dioxygenase Involved in Metabolism of o-Xylene, Toluene, and Ethylbenzene by *Rhodococcus* sp. Strain DK17[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7086-7092.
- [47] Di Canito A, Zampolli J, Orro A, et al. Genome-based analysis for the identification

- of genes involved in o-xylene degradation in *Rhodococcus opacus* R7[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 587-603.
- [48] 梁书利. 基于 RNA-Seq 技术的毕赤酵母转录组学研究及其表达元件的挖掘[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [49] Wang H K, Yan H, Shin J, et al. Activity against plant pathogenic fungi of *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 isolated from Xinjiang koumiss in China[J]. *Annals of Microbiology*, 2011, 61(4): 879-885.
- [50] 陈惠, 辛丽丽, 龚婕宁. 基于全转录组测序技术的转录组学在中医药领域的应用前景分析[J]. 环球中医药, 2013, 6(10): 45-49.
- [51] 罗辉, 叶华, 肖世俊, 等. 转录组学技术在水产动物研究中的运用[J]. 水产学报, 2015, 039(004): 598-607.
- [52] Zhai L, Liu Z, Zou X, et al. Genome-wide identification and analysis of microRNA responding to long-term waterlogging in crown roots of maize seedlings[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(15): 4157-4168.
- [53] Bisanz J E, Macklaim J M, Gloor G B, et al. Bacterial metatranscriptome analysis of a probiotic yogurt using an RNA-Seq approach[J]. *International Dairy Journal*, 2014, 39(2): 284-292.
- [54] 刘伟, 郭光艳, 秘彩莉. 转录组学主要研究技术及其应用概述[J]. 生物学教学, 2019, 44(10): 2-5.
- [55] 史硕博, 陈涛, 赵学明. 转录组平台技术及其在代谢工程中的应用[J]. 生物工程学报, 2010, 26(9): 1187-1198.
- [56] Malone J H, Oliver B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome[J]. *BMC Biology*, 2011, 9(1): 34-42.
- [57] Morozova O, Marra M A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics[J]. *Genomics*, 2008, 92(5): 255-264.
- [58] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(23): 2776-2777.
- [59] Mostafa R, Samer K, Bertil P, et al. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 242(1): 84-89.
- [60] Bentley D R, Balasubramanian S, Swerdlow H P, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry[J]. *Nature*, 2008, 456(7218): 53-59.
- [61] Metzker M L. Sequencing technologies-the next generation[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(1): 31-46.
- [62] Rhoads A, Au K F. PacBio Sequencing and Its Applications[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015, 13: 278-289.

- [63] Ugrappa N, Zhong W, Karl W, et al. The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing[J]. *Science*, 2008, 320(5881): 1344-1349.
- [64] Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, et al. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution[J]. *Nature*, 2008, 453: 1239-1245.
- [65] Tripathy S, Sen R, Padhi S K, et al. Survey of the transcriptome of *Brevibacillus borstelensis* exposed to low temperature shock[J]. *Gene*, 2014, 550(2): 207-213.
- [66] Ting Z, Xiujun L, Chunna Y, et al. Transcriptome analyses provide insights into the expression pattern and sequence similarity of several taxol biosynthesis-related genes in three *Taxus* species[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 33-43.
- [67] 张彭义, 余刚, 蒋展鹏. 挥发性有机物和臭味的生物过滤处理[J]. *环境工程学报*, 2000, 1(1): 1-7.
- [68] 秦朝远, 乔彤森. 生物法处理气体中易挥发性有机物研究进展[J]. *石化技术与应用*, 2006, 24(1): 49-53.
- [69] Gibson D T. Microbial degradation of organic compounds: M. Dekker; 1984.
- [70] Baggi G P, Barbieri P, Galli E, et al. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades O-xylene[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1987, 53(9): 2129-2132.
- [71] Higson F K, Focht D D. Degradation of 2-methylbenzoic acid by *Pseudomonas cepacia* MB2[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(1): 194-200.
- [72] Dockyu K, Hwan L C, Nam C J, et al. Aromatic Hydroxylation of Indan by o-Xylene-Degrading *Rhodococcus* sp. Strain DK17[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2010, 76(1): 375-377.
- [73] 万桂龙. 微电场作用强化假单胞菌 *Pseudomonas* sp.DGYH-12 降解菲过程的机制研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2016.
- [74] 齐惠萍, 吕建明, 李常青. 毛细管气相色谱法测定水中苯、甲苯、二甲苯[J]. *海峡预防医学杂志*, 2012, 18(1): 67-68.
- [75] Qihui G, Qingping W, Jumei Z, et al. *Acinetobacter* sp. DW-1 immobilized on polyhedron hollow polypropylene balls and analysis of transcriptome and proteome of the bacterium during phenol biodegradation process[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4863-4880.
- [76] 施邑屏. 温度与微生物[J]. *微生物学通报*, 1982, 9(6): 41-44.
- [77] Prado δJ, Veiga M C, Kennes C. Effect of key parameters on the removal of formaldehyde and methanol in gas-phase biotrickling filters[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2006, 138(3): 543-548.
- [78] Lin Q, Jianlong W. Biodegradation characteristics of quinoline by *Pseudomonas putida*[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(19): 7683-7686.
- [79] Xiangqian W, Qiaoli W, Sujing L, et al. Degradation pathway and kinetic analysis for

- p-xylene removal by a novel *Pandoraea* sp strain WL1 and its application in a biotrickling filter[J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 288(may 15): 17-24.
- [80] 陈佩, 颜家保, 武文丽, 等. 邻二甲苯高效降解菌的分离及其降解特性[J]. 化工进展, 2016, 35(2): 565-569.
- [81] Robledo-Ortíz J R, Ramírez-Arreola D E, Pérez-Fonseca A A, et al. Benzene, toluene, and o-xylene degradation by free and immobilized *P. putida* F1 of postconsumer agave fiber/polymer foamed composites[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65(3): 539-546.
- [82] Tatusov R L, Galperin M Y, Natale D A, et al. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 33-36.
- [83] 黄珊. 基于转录组学与代谢组学的 *Streptococcus thermophilus* TF96 氨基酸代谢机制研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- [84] Akram M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 68: 475-478.
- [85] Forster Brian M, Marquis H. Protein transport across the cell wall of monoderm Gram-positive bacteria[J]. Molecular Microbiology, 2012, 84(3): 405-413.
- [86] Takahiro N, Ohya Y. The cell wall integrity checkpoint: coordination between cell wall synthesis and the cell cycle[J]. Yeast, 2010, 27(8): 513-519.
- [87] Michael E. Timeline: Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003, 4(5): 414-418.

## 7 攻读硕士学位期间发表论文情况

- [1] 孙艺哲, 黄志勇, 李明雪, 师彦涛, 朱雨轩, 韩一凡. 生物滴滤法处理药厂高浓度丙酮废气的中试研究[J]. 化工环保, 2020 年 01 期, 104-109.
- [2] Mingxue Li, Yantao Shi, Yixuan Li, Yizhe Sun, Chunhui Song, Zhiyong Huang, Zongzheng Yang, Yifan Han. Shift of microbial diversity and function in high efficiency performance biotrickling filter on gaseous xylene treatment[J]. Journal of the Air & Waste Management Association, 2019, 69(9), 1059-1069.

## 8 致 谢

本论文是在导师郁彭教授和黄志勇研究员的精心指导下完成的。感谢郁老师在学术上对我的指导。同时感谢黄老师对我工作和生活的悉心指导和帮助。黄老师思维敏捷，大胆创新，对于学术研究有着深刻的理解和不断进取的科研态度，对我影响颇深。时光飞逝，三年的研究生学习生涯已接近尾声，回想起导师三年来对我学习、工作和生活的指导，教诲我要把一件事情做好，使我在这三年的时间里快速学习和成长。在此向两位老师表示衷心的感谢。

感谢韩一凡师兄。韩师兄知识功底深厚，对相关研究领域的内容了解广泛，同时对于科研成果转化也具有独到的见解。在论文完成的过程中，韩师兄对论文的方向和研究细节进行指导，为我的研究提供了极大的帮助，为本论文的完成起到了至关重要的作用。

感谢技术支撑平台的雷宇老师和廖小平老师在转录组测序和生物信息学分析方面给予的指导和帮助，才能使论文顺利完成。

感谢实验室的张小霞、王兴彪、王敬敬、赵维、徐松、杨蓉、侍浏洋、高小龙等老师对我学习及生活中的帮助。感谢贺倩倩、李晴晴、李明雪、王丽洁、赵思琦、马磊、朱丹、朱婉瑜、绳平等伙伴在工作方面的帮助与生活中的陪伴，让我们度过了美好的时光，使我三年的学习生活变得更加充实饱满。

最后，感谢我的父母及家人，你们在精神上的鼓励和经济上的支持，才能使我安心的专注于学术研究，给予我学习的动力。

孙艺哲  
2020年4月

## 9 附 录

邻二甲苯降解菌 LEJB-4 的 16S rDNA 序列:

```

ACCATGCAGTCGACGATGAAGCCCAGCTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGG
TGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTCAGGATAAGCCTGGGAAACTGG
GTCTAATACCGGATATGACCAAAGGCTGCATGGTTTGGTGGAAAGTTTCGG
TGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGGTGGGTAATGCCCTACCAAG
GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC GCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGCG
AAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTCGGGTTGTAAAC
CTCTTCACCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGGAGAAGAACCG
CCAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAA
TTACTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGTTGTCGCGTCTGTGAAATCCCG
CAGCTCAACTGCGGGCTTGCAAGGCGATA CGGGCAA ACTCGAGTACTGCAGGGG
AGACTGGAATT CCTGGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCG
GTGGCGAAGGC GGCTCTGGCAGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG
GTAGCGAACAGGATTAGATA CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGCTA
GGTGTGGTTT CTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCC
GCCTGGGAGTACGGCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCG
CACAGCGCGGAGCATGTGGATTAATTGATGCAACCGAAGAACCTTACCTG
GGTTGACATATA CCGGACGACTGCAGAGATGTGGTTCCCTGTGGCGGTATA
CAGGTGGTGCATGGCTGTCGT CAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCTTGTCCGTGTGCCAGCACGTAATGGTGGGACTCGC
AGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCA
TGCCCCTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCGGTACAGAGGGCTGC
GATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAGCCGGTCTCAGTCGGATGGGGT
CTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGC
TGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTACGTCATGAAAGT
CGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTGTGGGAG

```