



## 研究报告

## 活性污泥中群体感应淬灭菌的分离纯化及功能验证

廖家龙 郑雪漫 黎双飞 徐芳芳\*

深圳大学生命与海洋科学学院 广东省植物表观遗传学重点实验室 深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室 深圳市微生物基因工程重点实验室 广东 深圳 518055

**摘要:**【背景】近年来,群体感应淬灭(Quorum Quenching, QQ)技术在膜生物污堵防控中的应用研究受到了广泛关注。然而,目前已成功分离纯化的高效 QQ 菌有限,更多高效 QQ 菌资源亟待挖掘。

【目的】从实际运行的膜生物反应器(Membrane Bioreactor, MBR)活性污泥中采样,分离并富集高效 QQ 菌。【方法】以根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) A136 为报告菌株,使用指示琼脂平板法测定各菌株的 N-辛酰基高丝氨酸内酯(N-Octanoyl-DL-Homoserine Lactone, C8-HSL)降解能力。以紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*) VIR24 为报告菌株,定量测定所得 QQ 菌降解 N-己酰高丝氨酸内酯(N-Hexanoyl-DL-Homoserine Lactone, C6-HSL)信号分子的能力。通过微生物形态、生理生化及 16S rRNA 基因序列测定、构建系统发育树、扫描电子显微镜形态观测等方法对菌株进行分类学鉴定。用共培养法分析 QQ 菌对生物膜形成的抑制能力,通过聚乙烯醇和海藻酸钠包埋固定化 QQ 菌。【结果】筛选出了 6 株高效 QQ 菌,其中对 C8-HSL 分解能力最强的为杆状、革兰氏阴性戴尔福特菌属(*Delftia* sp.) JL5。定量分析结果表明菌株 JL5 能在 10 h 内完全降解 C6-HSL。菌株 JL5 显著抑制铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1 和菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*) SK-1 生物膜的形成。固定化后的 JL5 微球仍具有高效的 C6-HSL 和 C8-HSL 信号分子分解能力,而且分解速度较被广泛报道的红球菌(*Rhodococcus* sp.) BH4 更快。【结论】研究分离得到了高效 QQ 菌,能够有效抑制 N-酰基高丝氨酸内酯(N-Acyl-Homoserine Lactones, AHL)型群体感应菌生物膜的形成,固定化后仍然具有强 QQ 活性,具备广泛的应用前景,为后续 QQ 膜生物污堵防控技术的实践应用奠定了基础。

**关键词:** 群体感应, 群体感应淬灭, 细菌分离, 膜防污

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2020YFD0901003); National Natural Science Foundation of China (31500655); Shenzhen Natural Science Foundation (20200812135756002)

\*Corresponding author: Tel: 86-755-26535130; E-mail: ff.xu@szu.edu.cn

**Received:** 06-01-2021; **Accepted:** 23-03-2021; **Published online:** 28-04-2021

**基金项目:** 国家重点研发计划(2020YFD0901003); 国家自然科学基金(31500655); 深圳市自然科学基金(20200812135756002)

\*通信作者: Tel: 0755-26535130; E-mail: ff.xu@szu.edu.cn

**收稿日期:** 2021-01-06; **接受日期:** 2021-03-23; **网络首发日期:** 2021-04-28

## Isolation and characterization of indigenous quorum quenching bacteria from activated sludge

LIAO Jialong ZHENG Xueman LI Shuangfei XU Fangfang\*

Guangdong Provincial Key Laboratory for Plant Epigenetics, Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresources and Ecology, Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518055, China

**Abstract: [Background]** In recent years, the application of quorum quenching (QQ) technology in the prevention and control of membrane biofouling has received extensive attention. However, limited QQ bacteria have been successfully isolated and identified. More efficient signal molecule degrading bacteria awaits identification and further investigation. **[Objective]** Isolate more efficient QQ bacteria from native real membrane bioreactor (MBR) activated sludge and extending QQ bacteria resources. **[Methods]** *Agrobacterium tumefaciens* A136 was used as the reporter strain, to test isolated strain's C8-HSL (N-octanoyl-DL-homoserine lactone) degradation. Reporter *Chromobacterium violaceum* VIR24 was used to quantify signal molecules degradation of QQ bacteria. 16S rRNA gene sequencing was used to identify isolated bacteria, phylogenetic trees taxonomic of the isolates were then constructed. Scanning electron microscopy (SEM) was used to determine the morphology of bacteria. Coculture of QQ strain and typical biofilm forming bacteria was conducted to analyze biofilm inhibition ability of isolates. QQ beads was prepared using polyvinyl alcohol and sodium alginate. **[Results]** Six QQ strains were successfully isolated and identified, among which a Gram negative rod strain *Delftia* sp. JL5 showed the highest efficiency in C8-HSL degradation. Besides, our results showed that JL5 significantly inhibited biofilm formation of both *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Pantoea ananatis* SK-1, which are two typical N-acyl-homoserine lactones (AHL) dependent biofilm forming bacteria. Furthermore, JL5 remained high AHL degrading activity after being entrapped in QQ beads. Its AHL degrading efficiency was higher than the widely reported *Rhodococcus* sp. BH4. **[Conclusion]** We successfully isolated QQ bacteria. The isolates showed high C6/C8-HSL degrading ability. The bacteria inhibited biofilm formation efficiently. This research set solid foundation for further application of QQ bacteria in biofouling control.

**Keywords:** quorum sensing, quorum quenching, bacterial isolation, anti-biofouling

膜生物污堵导致膜生物反应器(Membrane Bioreactor, MBR)的运行高能耗、高成本等问题,是制约 MBR 进一步推广应用的首要因素之一。膜生物污堵的传统解决方法包括物理清洗、化学清洗、膜材料改进、活性污泥条件改善、反应器运行模式调节等<sup>[1-2]</sup>,但这些方法都不能从根本上解决生物污堵的问题。近年来,利用群体感应淬灭(Quorum Quenching, QQ)技术控制膜污堵的研究受到了广泛关注。QQ 技术有望从生物的角度控制膜生物污堵的问题。形成膜生物污堵的首要原因在于微生物在膜材料表面附着、定殖并逐渐发展成为生物膜(Biofilm)<sup>[3]</sup>。生物膜的形成受到细菌群体感应(Quorum Sensing, QS)系统的调控, QS 是

指细菌通过生产、释放并检测特定的化学信号分子进行通讯,从而调控细菌群体行为的一种现象。当信号分子达到特定阈值后,细菌能够接收到信号并激活下游一系列功能基因的表达,如毒力表达<sup>[4]</sup>、抗生素分泌<sup>[5]</sup>、孢子形成<sup>[6]</sup>和生物膜形成<sup>[7]</sup>等。细菌的群体感应信号类型主要包括革兰氏阴性菌的 N-酰基高丝氨酸内酯(N-Acyl Homoserine Lactones, AHL)、革兰氏阳性菌的自诱导肽(Autoinducer Peptides, AIP)以及 2 类细菌跨物种交流的自诱导肽(Autoinducer-2, AI-2)。QQ 技术主要通过破坏细菌的信号分子、阻断菌间信号传导从而干扰和破坏细菌间的正常交流。QQ 途径主要包括抑制信号分子产生、分解或失活已产生的信

号分子、干扰信号分子与受体结合或破坏受体蛋白等<sup>[8]</sup>。近年来,基于群体感应淬灭理论的膜污染控制技术迅速发展,在实验室规模、中试规模 MBR 中的抗膜生物污垢效果均得到了有效验证,并有望投入实际应用中<sup>[9-12]</sup>。研究表明,堵塞的 MBR 膜组件表面含有种类丰富的细菌、真菌和原生生物等微生物,而且微生物的分布呈现显著的时空变化与域间关联性<sup>[13]</sup>,其中细菌之间存在广泛的通讯交流。研究已证明,革兰氏阴性菌在膜污垢中占据主导地位,而且 AHL 信号分子是 MBR 废水处理系统中最为普遍存在的信号分子之一<sup>[14]</sup>。因此,淬灭 AHL 类信号分子是有效减缓膜污垢的潜在手段。然而,当前可应用于防止膜污垢的 QQ 菌种单一,菌种资源匮乏。本文汇总了当前研究较多的 QQ-MBR 相关的菌株(见表 1),其中已进行中试应用测试的 AHL 型 QQ 菌仅有 *Rhodococcus* sp. BH4 一株。由于污水处理活性污泥是一个复杂的微生物群落,外源加入的细菌往往难以适应复杂的土著环境,因而会影响 QQ 效果。然而分离土著 QQ 菌可以在不影响污水处理水质的同时有效避免细菌的环境适应性问题,更易于实际应用。因此迫切需要从实际运行的 MBR 反应器中分离培养土著 QQ 微生物菌,进而建立和完善适应中国污水处理厂中水质状况的 QQ 菌库。

本研究从实际运行的 MBR 污水处理设备中分离纯化具有 AHL 降解能力的菌株,通过定性、定

量测定菌株对典型革兰氏阴性菌 N-酰基高丝氨酸内酯信号分子的降解能力、分析所得 QQ 菌对生物膜的抑制能力,筛选出高效 QQ 菌株,再对其进行菌种鉴定、包埋固定,并验证包埋后菌株的 QQ 活性,以期后续进一步应用到实际的 QQ-MBR 中提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

红球菌 *Rhodococcus* sp. BH4 (BH4)由首尔国立大学 Lee Chung-Hak 教授惠赠。用于生物膜抑制能力检测的 QS 菌株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1 (ATCC 15692)和菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*) SK-1 (ATCC 19321),以及报告菌株根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) A136 (Ti<sup>-</sup>, pCF218, pCF372, ATCC 51350)和紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*) VIR24 (ATCC 12472)均为实验室保存菌种。

### 1.2 培养基

用于 QQ 菌筛选的培养基包含: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 1.0 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.3 g/L, CaCl<sub>2</sub> 10.0 mg/L, FeCl<sub>3</sub> 0.1 mg/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.1 mg/L, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.1 mg/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 mg/L, pH 7.0-7.3, 1.0×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 25 min,待冷却后加入 399.5 mg/L 用 0.22 μm 针式滤器过滤除菌的 C8-HSL。

表 1 近年来废水中分离的 QQ 菌株

Table 1 QQ strains isolated from wastewater treatment systems in recent years

QQ 菌 QQ strain	可分解的 AHL Degradable AHL	QQ 酶 QQ enzyme	应用案例 Case studied	参考文献 References
<i>Pseudomonas</i> sp. 1A1	C6, C8, C10, C12, 3OC6, 3O, 3OC10, 3OC12	Acylase	Lab-scale MBR	[15]
<i>Rhodococcus</i> sp. BH4	C6, C8, C10L, C12, 3OC6, 3OC8, 3OC10, 3OC12	Lactonase	Lab-scale MBR, pilot-scale MBR	[16-17]
<i>Enterococcus</i> HEMM-1	C4-C14	Lactonase	AHL degradation	[18]
<i>Rhodococcus erythropolis</i> W2	3-O-HSL	Oxidoreductase	AHL degradation	[19]
<i>Bacillus</i> sp. T5	C8	Lactonase	Lab-scale MBR	[20]
<i>Bacillus cereus</i> HG10	C6-C10	Lactonase	Biofilm inhibition	[21]

### 1.3 主要试剂和仪器

AHL 型信号分子 N-己酰高丝氨酸内酯(N-Hexanoyl-DL-Homoserine Lactone, C6-HSL)与 N-辛酰高丝氨酸内酯(N-Octanoyl-DL-Homoserine Lactone, C8-HSL), Sigma 公司; LB 肉汤培养基、四环素、大观霉素、5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside, X-Gal)、二甲基亚砷(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、甲醇、结晶紫、乙酸、聚乙烯醇(Polyvinyl Alcohol, PVA)、海藻酸钠(Sodium Alginate, SA)、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、Tris-HCl 缓冲液、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 与  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、戊二醛与甘油, Macklin 公司。

高分辨扫描电镜, Thermo Scientific 公司; 多功能酶标仪, BioTek 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统, 上海复日科技有限公司。

### 1.4 QQ 菌的分离纯化

MBR 活性污泥样本源自深圳市某污水处理厂实际运行工艺。菌株分离纯化方法参考已建立的方法<sup>[22]</sup>。大致流程为: 将取得的活性污泥样品用超纯水稀释 10 倍后, 以 5% (体积分数)接种于 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 恒温振荡培养 48 h 后将培养液以 2% (体积分数)转移至以 399.5 mg/L C8-HSL 为唯一碳源的基本培养基中, 30 °C、200 r/min 恒温振荡富集培养 24 h。用无菌水将培养液稀释 100 倍后涂布到 LB 平板上, 30 °C 恒温培养 24–48 h, 挑取不同形态菌落进行分离纯化, 并对所有分离菌落进行 QQ 功能检测。

### 1.5 QQ 能力测定

QQ 能力测定通过分析细菌对信号分子 AHL 的分解情况进行表征。AHL 的定性测定采用报告菌 A136 的 X-Gal 生物显色法<sup>[17,23]</sup>。首先将分离菌株接种至 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养过夜, 将所得培养液稀释至  $OD_{600}$  为 1.0, 加入 200 nmol/L C8-HSL, 30 °C、200 r/min 分别孵育 5 h 和 10 h 后, 6 230×g 离心 5 min 取上清液, 用 0.45  $\mu\text{m}$

滤膜过滤除菌后-20 °C 保存备用。用含有 45  $\mu\text{g/mL}$  四环素、50  $\mu\text{g/mL}$  大观霉素和 200  $\mu\text{g/mL}$  X-Gal 及报告菌株 A136 的 LB 平板检测上清液中剩余的 C8-HSL 含量。30 °C 恒温培养 24 h 后观察指示平板显色圈的大小和颜色深浅。

AHL 的定量分析采用 VIR24 报告菌检测<sup>[24]</sup>。基本原理为 VIR24 接收到 AHL 信号分子后产生紫色素, 通过提取并测量紫色素的吸光值表征体系中信号分子的含量。将细菌接种到 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 用新鲜 LB 液体培养基稀释至  $OD_{600}$  为 1.0, 加入 10  $\mu\text{mol/L}$  C6-HSL 后 30 °C、200 r/min 振荡培养, 在 5 h、10 h 时分别取 500  $\mu\text{L}$  培养液, 6 230×g 离心 5 min 收集上清液, 将上清液放入 95 °C 恒温水浴锅灭活 5 min, 待冷却后于-20 °C 冷冻保存。将报告菌株 VIR24 于 LB 液体培养基中 30 °C、200 r/min 培养过夜后, 稀释至  $OD_{600}$  为 0.1 备用。取稀释液 1 000  $\mu\text{L}$  添加到 24 孔板中, 再分别加入标准样品(10、5、2.5、1.25  $\mu\text{mol/L}$  C6-HSL)和待测样品 20  $\mu\text{L}$ , 加入等体积无菌水作为阴性对照, 30 °C、200 r/min 恒温振荡培养 24 h。培养液 9 300×g 离心 5 min 后去上清, 加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砷重悬, 将细胞置于超声清洗仪 30 °C 水浴中, 600 W 处理 10 min, 11 600×g 离心 5 min, 取上清 100  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板中, 530 nm 下测样品的吸光值。

### 1.6 QS 活性验证

用报告菌株 A136 检测分离所得 QQ 菌的 AHL 信号分子生产能力。报告菌株 A136 接种于含有 45  $\mu\text{g/mL}$  四环素及 50  $\mu\text{g/mL}$  大观霉素的 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养过夜。将待测 QQ 菌接种至 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 48 h。11 600×g 离心 5 min 收集上清液, 并将上清液置于 95 °C 恒温水浴锅灭活 3 min, 冷却至室温。将上清液与 A136 菌液(含 200  $\mu\text{g/mL}$  X-Gal)以 1:10 混合后, 取 100  $\mu\text{L}$  至 96 孔板中, 30 °C 恒温培养过夜, 观察样品的显色情况。

## 1.7 QQ 菌的生物膜抑制能力分析

以典型 AHL 型群体感应铜绿假单胞菌 PAO1 和菠萝泛菌 SK-1 为测试对象, 分析分离所得 QQ 菌对 PAO1 和 SK-1 生物膜生长的抑制情况<sup>[25]</sup>。QQ 菌、PAO1 和 SK-1 分别在 30 °C、200 r/min 下 LB 液体培养基中培养过夜后, 用新鲜 LB 培养基稀释至  $OD_{600}$  为 0.05。分别取 100  $\mu$ L 单菌菌液或 1:1 混合后的混合菌液至 900  $\mu$ L LB 液体培养基中(24 孔板), 30 °C 孵育 24 h 后倒去培养液; 用灭菌水轻柔清洗 3 次, 去除游离细菌; 加入 95% 甲醇溶液, 室温孵育 10 min, 固定孔壁上的生物膜; 倒去甲醇溶液静置晾干, 加入 120  $\mu$ L 0.1% 的结晶紫溶液, 室温染色 15 min; 倒去结晶紫溶液, 缓慢冲洗 3–4 次吸干水分; 倒置孔板静置干燥, 加入 120  $\mu$ L 30% 乙酸溶液, 室温 180 r/min 下孵育 10–15 min 溶解结晶紫, 590 nm 下测定样本的吸光度。

## 1.8 QQ 菌的分类鉴定

### 1.8.1 QQ 菌的形态鉴定

在 LB 平板上观察 QQ 菌的菌落形态, 用革兰氏染色法于油镜下观察菌体形态。用扫描电子显微镜观察 QQ 菌形态<sup>[9]</sup>。QQ 菌接种于 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养过夜, 11 600 $\times$ g 离心 5 min 收集菌体, 重悬于 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 重复洗涤 2 次后加 1% 戊二醛固定 30 min。梯度乙醇脱水, 干燥, 粘样, 喷金并进行扫描电镜检测。

### 1.8.2 QQ 菌的生理生化分析

参照《伯杰细菌鉴定手册》(第 8 版)<sup>[26]</sup>和《微生物学实验》<sup>[27]</sup>对 JL5 进行葡萄糖氧化发酵试验、柠檬酸盐试验、淀粉水解试验、过氧化氢酶试验、明胶水解试验、硝酸盐试验、甲基红(M.R)试验、V.P 试验、吡啶试验、乙酰甲基甲醇试验。

### 1.8.3 QQ 菌的 16S rRNA 基因序列测定与分析

利用 16S rRNA 基因测序鉴定分离所得 QQ 菌株。用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取细菌基因组 DNA, 使用通用引物对 27F

(5'-AGATTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增细菌的 16S rRNA 基因<sup>[21]</sup>。纯化 PCR 产物并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果通过 NCBI 的 BLAST 进行序列识别, 再与 GenBank 数据库中的序列进行比对, 获得相关物种信息。将获得的分离株序列与已知的高效 QQ 菌株 *Rhodococcus* sp. BH4 的 16S rRNA 基因序列一起, 采用 MEGA 7.0 软件绘制系统发育树, 比较分离得到的 QQ 菌与 BH4 的亲缘关系。

## 1.9 固定化 QQ 菌的信号分子分解能力验证

### 1.9.1 QQ 菌的包埋固定

采用 PVA 和 SA 交联制备 QQ 微球<sup>[28]</sup>。配制 200 mL 的 12.5% PVA 和 1.25% SA 的混合液,  $1\times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。将 QQ 菌在 LB 液体培养基中 30 °C、200 r/min 培养 24 h, 6 230 $\times$ g 离心 10 min 收集菌体, 去除上清液后加去离子水重悬细菌。将 QQ 菌悬液与聚合溶液以 1:4 的比例混合后滴入 300 mL 饱和  $H_3BO_3$ - $CaCl_2$  混合液中交联反应 1 h。用去离子水清洗 2 次第一交联反应后的 QQ 微球, 继而将 QQ 微球放入 200 mL 的 0.5 mol/L  $Na_2SO_4$  溶液中反应 6–8 h, 去离子水洗涤 2–3 次后保存备用。

### 1.9.2 固定化 QQ 菌降解信号分子的能力验证

用传感菌 A136 表征所得 QQ 菌降解 C8-HSL 的能力。取 25 颗 PVA-SA 包埋的 QQ 微球加入 10 mL Tris-HCl 溶液(50 mmol/L, pH 7.0)中, 加入 200 nmol/L C8-HSL, 30 °C、200 r/min 振荡培养, 以空微球作为阴性对照。分别于 1、30、60、90 min 取样测定 C8-HSL 的分解情况。报告菌株 A136 指示琼脂平板制备过程同 1.5。以标准浓度 C8-HSL 为对照, 将不同时间点取得的样品滴加至 A136 指示平板的孔洞后 30 °C 培养 24 h, 观察平板上显色圈的大小及颜色。

## 2 结果与讨论

### 2.1 QQ 菌的分离

从实际运行的 MBR 污水处理设备中以 AHL 为

唯一碳源富集培养并经多次平板划线后分离得到纯培养物，从中挑取了 21 个单菌落进行富集培养 (分别命名为 B-3、A1-1、A1-2、A1-3、A1-4、A2-5、A2-6、A2-7、A2-8a、B-1、A2-9、A2-10、A4-11、A4-12、A4-13、A5-14、A6-15、A7-16、A8-17、A9-18 和 A2-19)。以目前研究最为广泛的高效 QQ 菌株 BH4 为阳性对照，对比分析了分离所得 21 株细菌的 C8-HSL 信号分子分解能力(图 1)。结果表明其中有 17 株菌能够有效降解 C8-HSL，具有 QQ 活性；其中 9 个菌株在 24 h 内将 C8-HSL 完全降解。从中挑选出原始命名为 A2-9、A4-13、A5-14、A6-15、B-1、B-3 的 6 株

具备较高 QQ 活性的细菌，进一步富集培养并依次正式命名为 JL5、SZU83、SZU18、XM19、FF19 和 SZU68。

2.2 QQ 菌株的 16S rRNA 基因测序

对分离纯化的 6 种 QQ 活性较高的分离株进行 16S rRNA 基因测序，结果如表 2 所示。

比对结果显示 6 株分离所得 QQ 菌分别属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、戴尔福特菌属(*Delftia* sp.)及不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)，比对结果与数据库中相关细菌的相似性接近 99%。值得注意的是，具有显著 C6-HSL 降解能力的菌株 JL5 与戴尔福特菌属的 *Delftia lacustris* 的相似性为 99.93%，

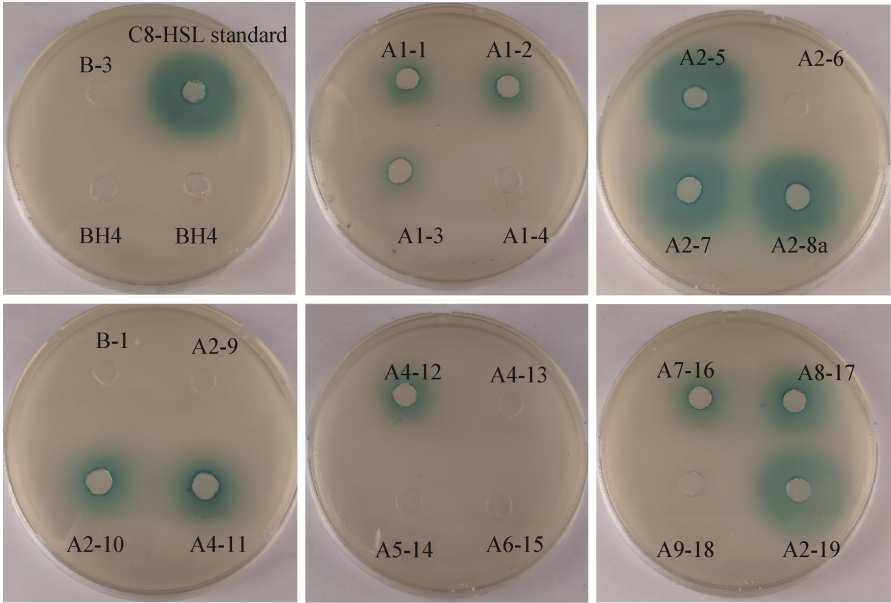


图 1 分离所得细菌的群体感应淬灭能力验证

Figure 1 Quorum quenching ability of isolated strains

注: BH4 为阳性对照

Note: BH4 is a positive control

表 2 分离所得的 QQ 菌测序结果

Table 2 Sequencing results of isolated QQ bacteria

原始命名	菌株	GenBank 登录号	相似菌株	相似性
Original name	Strains	GenBank accession No.	Similar strains	Similarity (%)
A2-9	JL5	MN559091.2	<i>Delftia lacustris</i> strain 332 (NR_116495.1)	99.93
A4-13	SZU83	MN559093.1	<i>Pseudomonas multiresinivorans</i> strain ATCC 700690 (NR_119225.1)	98.90
A5-14	SZU18	MN559094.1	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> strain WZBFD3-5A2 (NR_133020.1)	99.01
A6-15	XM19	MN559095.1	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> strain NBRC 12694 (NR_113601.1)	99.41
B-1	FF19	MN559097.1	<i>Acinetobacter modestus</i> strain NIPH 2369 (NR_148845.1)	98.06
B-3	SZU68	KY039272.1	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> strain DSM 14399 (NR_114975.1)	99.04

初步鉴定为 *Delftia* sp., 该菌已送至中国典型培养物保藏中心进行菌种保藏(保藏编号为 CCTCC M 2021139)。Gül 等<sup>[29]</sup>报道 *Delftia* sp. T6 具有显著降解 AHL 型信号分子的能力。此外, 相关研究报道 *Delftia* sp. 具有许多其他特性, 主要包括具有嗜盐/耐高盐能力(能耐受 $\geq 100$  mmol/L 的硒酸盐与 25 mmol/L 亚硒酸盐)、硝酸盐还原能力、细胞外肽聚糖降解能力、对许多类型重金属的耐受能力、多种有机化合物利用能力以及促进植物生长的能力<sup>[30-33]</sup>。然而应用 *Delftia* sp. 作为 QQ 菌应用于膜防污堵的研究鲜有报道。

将分离株的 16S rRNA 基因测序结果与已有的高效 QQ 菌 *Rhodococcus* sp. BH4<sup>[17]</sup> 的 16S rRNA 基因序列进行比对, 使用最大似然法构建系统发育树, 分析 6 个分离株与 BH4 的亲缘关系, 结果如图 2 所示。由分离株与高效 QQ 菌株 BH4 的系统发育树可看出, 6 株分离株由 4 个分支组成: SZU83、XM19 与 SZU18 构成一个以 *Pseudomonas* sp. 为代表的独立分支; JL5 与 FF19 处在同一分支, 但代表不同的属; BH4 单独处在一个分支上; SZU68 处在与其他分离株相对较远的分支上。观察分支结点与分支长度可知 JL5、FF19 与

SZU83、SZU18、XM19 的亲缘关系较近, 它们与 BH4 的亲缘关系稍远, SZU68 与 SZU83、SZU18、FF19、XM19、JL5 的亲缘关系都较远。JL5 与已报道具有高效 QQ 能力的 BH4 属于不同属。此外, 序列比对结果显示 SZU83、SZU18、XM19 与 SZU68 均属于 *Pseudomonas* sp., 但 SZU68 与 SZU83、SZU18、XM19 处于距离较远的不同分支。

### 2.3 分离菌株的 QQ 能力定量检测

为定量分析所得 QQ 菌对 AHL 型信号分子的降解能力, 使用报告菌株 VIR24 测定了 6 株 QQ 菌对 C6-HSL 降解能力, 通过 C6-HSL 的浓度变化表征分离株的 QQ 活性(图 3)。结果表明共同培养 5 h 后, JL5 将 C6-HSL 从初始的 10.0  $\mu\text{mol/L}$  降低至 1.2  $\mu\text{mol/L}$ , 降解率达 88%, 而其他分离株 SZU83、SZU18、XM19、FF19 和 SZU68 降解了约 40%–50% 的 C6-HSL; 培养 10 h 后, JL5 几乎完全降解体系中的 C6-HSL, SZU18 和 SZU83 的降解量达到 70%; SZU68、XM19、FF19 的降解量分别为 60%、58% 和 68%, 对 C6-HSL 的分解能力弱于 JL5、SZU18 和 SZU83。不加任何菌株的 C6-HSL 对照样中, 经过 10 h 的培养后 C6-HSL 的含量略微下降, 信号分子的自然降解率大约为 10%。

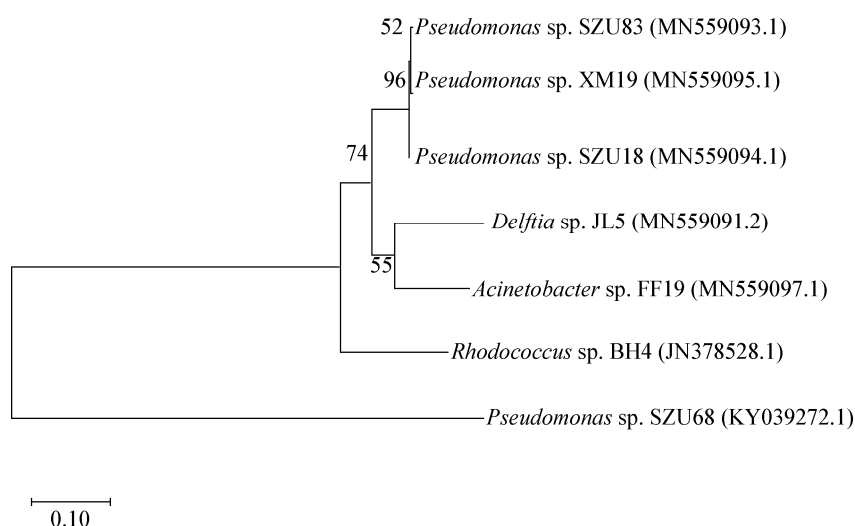


图 2 分离纯化所得的 QQ 菌与已有 QQ 菌 BH4 的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of newly isolated strains and previously reported *Rhodococcus* sp. BH4



上述结果表明菌株 JL5 具备较强的 AHL 信号分子降解能力(10 h 时已基本将培养液中的 C6-HSL 完全降解),其他 5 株细菌同样具有较好的该降解能力,但较菌株 JL5 弱。此外,除了菌株 SZU68,大部分分离株在前 5 h 的 C6-HSL 降解速率比后 5 h 大。上述结果表明 6 株细菌均具有 AHL 信号分子降解能力,在后续研究中具备潜在的应用价值。根据上述筛选结果,选取了最高效的 QQ 菌 JL5 为对象,继续深入研究其细菌形态、对典型模式菌的生物膜形成抑制能力及固定化后的 QQ 效果。

## 2.4 高效 QQ 菌 JL5 的形态学和生理生化分析

菌株 JL5 在 LB 平板上呈不透明的淡黄色菌落,菌落边缘整齐、表面光滑、圆形凸起,革兰氏染色呈阴性。扫描电镜结果表明 JL5 呈杆状,菌体长度约为 2.6–3.1  $\mu\text{m}$ ,宽度约为 0.6–0.8  $\mu\text{m}$  (图 4)。葡萄糖氧化发酵试验、柠檬酸盐试验、过氧化氢酶试验结果呈阳性,M.R 试验、吲哚试验、V.P 试验、淀粉水解试验、明胶水解试验、乙酰甲基甲醇试验及硝酸盐试验结果呈阴性。

## 2.5 菌株 JL5 的生物膜抑制能力分析

铜绿假单胞菌 PAO1 和菠萝泛菌 SK-1 是典型的 AHL 型 QS 细菌,其生物膜的产生受 QS 过程的

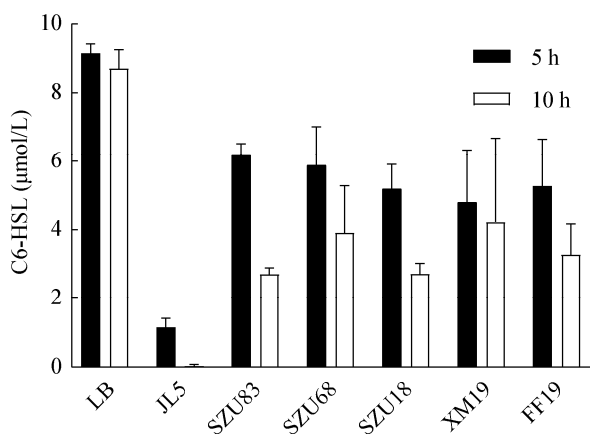


图 3 QQ 菌降解 C6-HSL

Figure 3 QQ bacteria degraded C6-HSL

注: 实心、空心柱子分别表示 5 h、10 h 时剩余的信号分子的量  
Note: The solid column and the hollow column indicate the degradation of the signal molecule at 5 h and 10 h, respectively

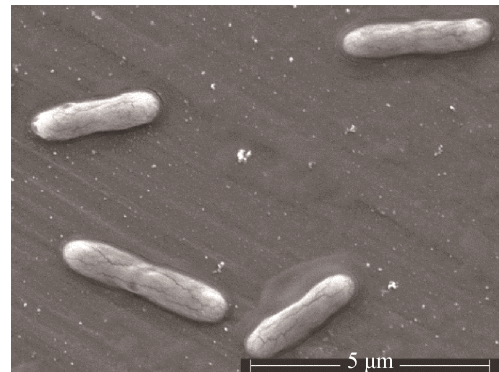


图 4 JL5 扫描电镜观察结果(15 000×)

Figure 4 Scanning electron microscope (SEM) observation of JL5 (15 000×)

调控。为了检测 JL5 抑制生物膜形成的能力,将其与 PAO1 和 SK-1 共同培养,并测定了共培养前后生物膜形成的差异。结果如图 5 所示,空白对照组 LB 培养基中基本无生物膜的形成,JL5 形成生物膜的能力较弱,而 PAO1 和 SK-1 在单独培养时具有极强的生物膜形成能力,而 JL5 的加入将 PAO1 和 SK-1 的生物膜形成量分别降低了 57%和 68%,说明 JL5 对 PAO1 和 SK-1 的生物膜形成有显著的抑制能力。

## 2.6 固定化 JL5 微球的 QQ 能力检测

将 JL5 与 PVA 和 SA 的混合液在饱和硼酸氯化钙混合溶液中进行第一交联反应,在 0.5 mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液中进行第二交联反应,获得直径约

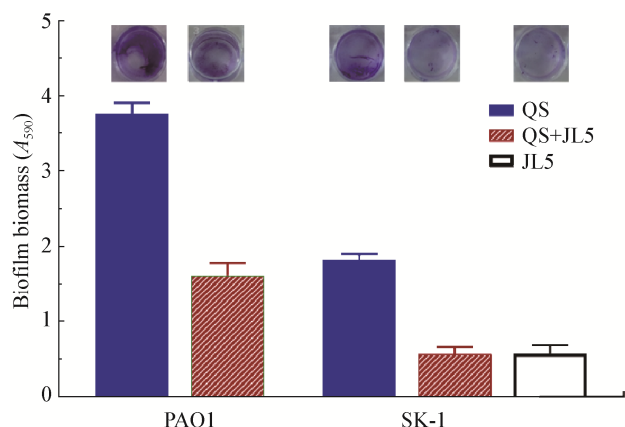


图 5 JL5 对 PAO1 和 SK-1 生物膜形成抑制作用分析

Figure 5 Inhibition of PAO1 and SK-1 biofilm formation via JL5



为 4 mm、密度约为 1.06 mg/mL、大小接近、形态均一的细菌包埋珠(图 6A), 其包埋后的电镜照片如图 6B 所示。通过报告菌株 A136 指示琼脂平板法分析了固定化 JL5 微球的 C8-HSL 降解能力, 以确认包埋后 QQ 菌的活性。结果表明包埋微球具备较强的韧性及稳定性, 形态和结构完整, 并未出现破损、变形等不良情况。JL5 微球、BH4 微球和无菌的空微球分别与 200 nmol/L C8-HSL 共培养 1、30、60 和 90 min 后, 通过报告菌株 A136 指示琼脂平板法测定了剩余信号分子的浓度(图 6C)。结果表明, JL5 微球显示出较强的 C8-HSL 降解能力, 1 min 时加样孔周围的蓝圈尺寸与对照组相当; 30 min 后加样孔周围的蓝圈范围明显变小, C8-HSL 的量开始快速降低; 60 min 时, 加样孔周围的蓝圈范围极小, 颜色较浅; 90 min 后加样孔周围蓝色消失, 表明 C8-HSL 已被完全降解。BH4 微球培养液在 90 min 时仍观察到颜色圈, 表明 C8-HSL 未完全降解。定量分析结果表明(图 6D), JL5 和 BH4 在 30、60、90 min 时的降解率分别为 70%、91%、98%和

50%、73%、88%, 相同时间内 JL5 的降解速率较 BH4 高, 而 90 min 时对照组空微球中 C8-HSL 自然降解率约为 5%, 自然降解可能因为微球的吸附作用。因此, PVA 与海藻酸钠混合材料的包埋过程并未破坏 JL5 的 QQ 活性, 包埋固定化后的 JL5 微球能在 90 min 内将 C8-HSL 完全降解, 而且降解速率高于目前研究最为广泛的 BH4 菌株。

上述结果综合表明了 JL5 具备高效的 AHL 型信号分子降解能力, 能有效抑制典型 QS 模式菌的生物膜形成, 包埋固定化后仍具备高 QQ 活性, 但其分解 AHL 的分子机制有待进一步探究。目前已发现的细菌 AHL 分解酶通常包括三大类, 即内酯酶<sup>[34]</sup>、酰基转移酶<sup>[35]</sup>和氧化还原酶<sup>[36]</sup>。内酯酶作用于高丝氨酸内酯环, 通过打开内酯环使信号分子失去活性, 该过程与 pH 介导的内酯环水解类似, 可以简单地通过降低 pH 值使内酯环重新闭合, 从而使 AHL 恢复活性。酰基转移酶则作用于信号分子的酰基侧链, 通过切断侧链中的酰胺键, 将信号分子分解成脂肪酸和高丝氨酸内酯环, 该分

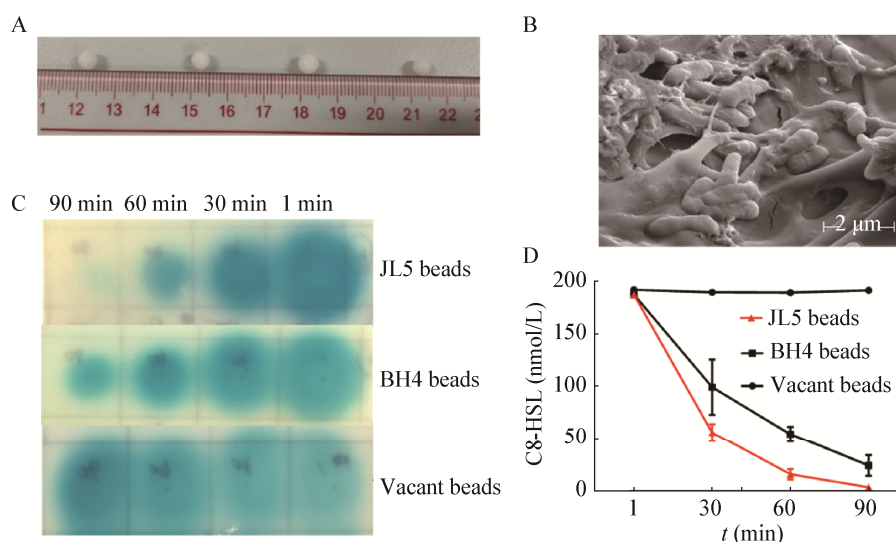


图 6 JL5 固定化微球的 QQ 能力分析

Figure 6 QQ activity of JL5 beads

注: A: JL5 固定化微球; B: JL5 固定化微球电镜照片(放大倍数 15 000×); C: JL5 微球、BH4 微球及空微球的 C8-HSL 降解能力比较; D: JL5 微球、BH4 微球及空微球的 C8-HSL 降解时间曲线

Note: A: Immobilized QQ beads; B: SEM picture of immobilized JL5 beads (magnification 15 000×); C: C8-HSL degradation comparison between JL5 beads, BH4 beads and vacant beads; D: C8-HSL degradation time course of JL5 beads, BH4 beads and vacant beads

解过程不可逆。氧化还原酶的报道相对较少, 这一类酶不降解信号分子, 而是通过氧化或还原酰基侧链对信号分子进行修饰。本研究对 JL5 分解信号分子的机制进行了初步探索, 发现 JL5 降解信号分子的酶位于细胞内, 而且被 JL5 分解后的信号分子活性不可逆, 表明 JL5 的 QQ 酶更有可能属于酰基转移酶类, 具体的信号分子降解机制有待进一步深入研究。

### 3 结论

本研究从实际运行的 MBR 活性污泥样本中成功富集培养并纯化出了 6 株高效土著 QQ 菌, 其中 *Delftia* sp. JL5 是一株具极强群体感应淬灭能力的细菌, 该属的细菌曾被报道具有硝酸盐还原、高盐耐受、抵抗多种重金属等能力, 但该菌属在 QQ-MBR 中的应用鲜有报道, 有待进一步深入研究。本研究验证了 JL5 能够高效降解 C6-HSL 和 C8-HSL, 可有效地抑制典型 AHL 型群体感应的革兰氏阴性菌 PAO1 及 SK-1 生物膜的形成。此外, 包埋固定化后的菌株 JL5 依然保持了高 QQ 活性, 能够有效降解信号分子, 因此在基于群体感应淬灭的 MBR 膜生物污染防控领域具有较大的应用潜力。然而, 菌株 JL5 降解信号分子的分子机制、包埋固定化后其在实验室水平及工程水平 MBR 中膜防污堵的能力、在 MBR 中 QQ 活性的稳定性、耐用性及环境适应性问题有待进一步完善与研究。

**致谢:** 感谢深圳大学测试中心为本论文研究提供高分辨率扫描电子显微镜, 为完成本课题提供平台支持, 感谢首尔国立大学 Lee Chung-Hak 教授惠赠红球菌 *Rhodococcus* sp. BH4 (BH4)。

### REFERENCES

- [1] Ni LF, Wang YY. Advances in MBR biofouling control based on quorum sensing and quenching[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2019, 51(8): 191-200 (in Chinese)  
倪凌峰, 王亚宜. 基于群体感应淬灭理论的 MBR 膜污染控制技术进展[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2019, 51(8): 191-200
- [2] Meng FG, Zhang SQ, Oh Y, Zhou ZB, Shin HS, Chae SR. Fouling in membrane bioreactors: an updated review[J]. Water Research, 2017, 114: 151-180
- [3] Yeon KM, Cheong WS, Oh HS, Lee WN, Hwang BK, Lee CH, Beyenal H, Lewandowski Z. Quorum sensing: a new biofouling control paradigm in a membrane bioreactor for advanced wastewater treatment[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(2): 380-385
- [4] Pirhonen M, Flego D, Heikinheimo R, Palva ET. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*[J]. The EMBO Journal, 1993, 12(6): 2467-2476
- [5] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(2): 269-275
- [6] Chhabra SR, Stead P, Bainton NJ, Salmond GS, William P, Bycroft BW. Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *erwinia-carotovora* by analogs of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone[J]. Journal of Antibiotics, 1993, 46(3): 441-454
- [7] Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm[J]. Science, 1998, 280(5361): 295-308
- [8] Rasmussen TB, Givskov M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects[J]. Microbiology: Reading, England, 2006, 152(Pt 4): 895-904
- [9] Kim SR, Oh HS, Jo SJ, Yeon KM, Lee CH, Lim DJ, Lee CH, Lee JK. Biofouling control with bead-entrapped quorum quenching bacteria in membrane bioreactors: physical and biological effects[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(2): 836-842
- [10] Yu H, Lee K, Zhang X, Choo KH. Core-shell structured quorum quenching beads for more sustainable anti-biofouling in membrane bioreactors[J]. Water Research, 2019, 150: 321-329
- [11] Lee K, Lee S, Lee SH, Kim SR, Oh HS, Park PK, Choo KH, Kim YW, Lee JK, Lee CH. Fungal quorum quenching: a paradigm shift for energy savings in membrane bioreactor (MBR) for wastewater treatment[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(20): 10914-10922
- [12] Lee SH, Lee S, Lee K, Nahm CH, Kwon H, Oh HS, Won YJ, Choo KH, Lee CH, Park PK. More efficient media design for enhanced biofouling control in a membrane bioreactor: quorum quenching bacteria entrapping hollow cylinder[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(16): 8596-8604
- [13] Jeong SY, Yi T, Lee CH, Kim TG. Spatiotemporal dynamics and correlation networks of bacterial and fungal communities in a membrane bioreactor[J]. Water Research, 2016, 105: 218-230
- [14] Lee K, Yu HR, Zhang XL, Choo KH. Quorum sensing and

- quenching in membrane bioreactors: opportunities and challenges for biofouling control[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 270: 656-668
- [15] Cheong WS, Lee CH, Moon YH, Oh HS, Kim SR, Lee SH, Lee CH, Lee JK. Isolation and identification of indigenous quorum quenching bacteria, *Pseudomonas* sp. 1A1, for biofouling control in MBR[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, 52(31): 10554-10560
- [16] Oh HS, Kim SR, Cheong WS, Lee CH, Lee JK. Biofouling inhibition in MBR by *Rhodococcus* sp. BH<sub>4</sub> isolated from real MBR plant[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(23): 10223-10231
- [17] Oh HS, Yeon KM, Yang CS, Kim SR, Lee CH, Park SY, Han JY, Lee JK. Control of membrane biofouling in MBR for wastewater treatment by quorum quenching bacteria encapsulated in microporous membrane[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(9): 4877-4884
- [18] Ham SY, Kim HS, Cha E, Park JH, Park HD. Mitigation of membrane biofouling by a quorum quenching bacterium for membrane bioreactors[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 258: 220-226
- [19] Uroz S, Chhabra SR, Cámara M, Williams P, Oger P, Dessaux Y. N-acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities[J]. *Microbiology: Reading, England*, 2005, 151(Pt10): 3313-3322
- [20] Gül BY, Imer DY, Park PK, Koyuncu I. Selection of quorum quenching (QQ) bacteria for membrane biofouling control: effect of different Gram-staining QQ bacteria, *Bacillus* sp. T5 and *Delftia* sp. T6, on microbial population in membrane bioreactors[J]. *Water Science and Technology*, 2018, 78(1/2): 358-366
- [21] Zhao C, Wang WZ, Xu QY. Isolation of quorum quenching bacteria and their function for controlling membrane biofouling[J]. *Environmental Science*, 2016, 37(12): 4720-4726 (in Chinese)
- 赵畅, 王文昭, 徐期勇. 群体感应淬灭菌的分离及其膜污染控制性能[J]. *环境科学*, 2016, 37(12): 4720-4726
- [22] Zhang C, Zhan SJ, Wang J, Liu ZJ, You H, Jia YH. Isolation and characterization of seven quorum quenching bacteria for biofouling control in MBR[J]. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 2017, 19(4): 991-1001
- [23] Fuqua C, Winans SC. Conserved *cis*-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(2): 435-440
- [24] Someya N, Morohoshi T, Okano N, Otsu E, Usuki K, Sayama M, Sekiguchi H, Ikeda T, Ishida S. Distribution of N-acylhomoserine lactone-producing fluorescent pseudomonads in the phyllosphere and rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.)[J]. *Microbes and Environments*, 2009, 24(4): 305-314
- [25] O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay[J]. *Journal of Visualized Experiment*, 2011, 47: e2437
- [26] Buchanan RE, Gibbs N. *Bergey's Bacterial Identification Manual*[M]. Beijing: Beijing Science Press, 1984 (in Chinese)
- 布坎南, 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984
- [27] Cai XZ, Huang JH. *Microbiological Experiment*[M]. Beijing: Beijing Science Press, 2010 (in Chinese)
- 蔡信之, 黄君红. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2010
- [28] Lee S, Park SK, Kwon H, Lee SH, Lee K, Nahm CH, Jo SJ, Oh HS, Park PK, Choo KH, et al. Crossing the border between laboratory and field: bacterial quorum quenching for anti-biofouling strategy in an MBR[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(4): 1788-1795
- [29] Gül BY, Koyuncu I. Assessment of new environmental quorum quenching bacteria as a solution for membrane biofouling[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 61: 137-146
- [30] Wadgaonkar SL, Nanchaiah YV, Jacob C, Esposito G, Lens PNL. Microbial transformation of Se oxyanions in cultures of *Delftia lacustris* grown under aerobic conditions[J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 57(5): 362-371
- [31] Jørgensen NOG, Brandt KK, Nybroe O, Hansen M. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from freshwater and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 2195-2199
- [32] Wu WY, Huang HY, Ling ZM, Yu ZS, Jiang YM, Liu P, Li XK. Genome sequencing reveals mechanisms for heavy metal resistance and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Delftia lacustris* strain LZ-C[J]. *Ecotoxicology*: London, England, 2016, 25(1): 234-247
- [33] Ubalde MC, Braña V, Sueiro F, Morel MA, Martínez-Rosales C, Marquez C, Castro-Sowinski S. The versatility of *Delftia* sp. isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies[J]. *Current Microbiology*, 2012, 64(6): 597-603
- [34] Dong YH, Xu JL, Li XZ, Zhang LH. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(7): 3526-3531
- [35] Leadbetter JR, Greenberg EP. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(24): 6921-6926
- [36] Chowdhary PK, Keshavan N, Nguyen HQ, Peterson JA, González JE, Haines DC. *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(50): 14429-14437