

活性污泥菌胶团/生物絮团形成菌的分离鉴定及基因组分析

刘亚琦 刘双元 高娜 戴景程 邱东茹

ISOLATION, IDENTIFICATION AND GENOMICS ANALYSIS OF ACTIVATED SLUDGE FLOC/BIOFLOC FORMING *PSEUDODUGANELLA EBURNEA* STRAINS

LIU Ya-Qi, LIU Shuang-Yuan, GAO Na, DAI Jing-Cheng, QIU Dong-Ru

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.080>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

凡纳滨对虾育苗水体中三种生物絮团的菌群多样性及Tax4Fun基因功能预测分析

IMPACTS OF *LITOPENAEUS VANNAMEI* ON MICROBIAL DIVERSITY OF THREE BIOFLOC AND PREDICTIVE ANALYSIS OF TAX4FUN GENE FUNCTION DURING HATCHERY PERIOD IN WATER

水生生物学报. 2019, 43(4): 786–796 <https://doi.org/10.7541/2019.093>

副地衣芽孢杆菌FA6全基因组测序及比较基因组学分析

WHOLE GENOME SEQUENCING AND COMPARATIVE ANALYSIS OF *BACILLUS PARALICHENIFORMIS* FA6 STRAIN

水生生物学报. 2020, 44(2): 261–267 <https://doi.org/10.7541/2020.031>

基于简化基因组测序的大黄鱼耐高温性状全基因组关联分析

GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY OF THERMAL TOLERANCE IN LARGE YELLOW CROAKER *LARIMICHTHYS CROCEA* BASED ON SLAF-SEQ TECHNOLOGY

水生生物学报. 2017, 41(4): 735–740 <https://doi.org/10.7541/2017.91>

太平洋鳕线粒体全基因组测序及结构特征分析

ANALYSIS OF COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME SEQUENCES OF *GADUS MACROCEPHALUS*

水生生物学报. 2019, 43(1): 17–26 <https://doi.org/10.7541/2019.003>

基于第二代测序技术兰州鲇线粒体基因组全序列测定与分析

SEQUENCING AND ANALYSIS OF THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF *SILURUS LANZHOUENSIS* BASED ON NEXT GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGIES

水生生物学报. 2017, 41(2): 334–345 <https://doi.org/10.7541/2017.41>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.080

活性污泥菌胶团/生物絮团形成菌的分离鉴定及基因组分析

刘亚琦^{1,2} 刘双元^{2,3} 高娜^{2,3} 戴景程^{2,3} 邱东茹^{2,3}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 大连 116023; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072;
3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 从云南省泸西县的污水处理厂分离到一株菌胶团形成菌YN12, 经过鉴定与象牙白伪杜榭氏菌(*Pseudoduganella eburnea*)10R5-21^T模式株具有较近的亲缘关系, 属于同一物种。为揭示该菌株与其他活性污泥细菌间菌胶团形成机制及碳源利用方面的异同, 对该菌株进行全基因组测序、组装、注释及比较基因组学分析。结果表明: *P. eburnea* YN12株基因组大小约为5934 kb, G+C含量为63.9%, 包含5313个蛋白质编码序列, 具有与喜树脂动胶菌(*Zoogloea resiniphila*)MMB株、解叔丁醇水居菌(*Aquicola tertiaricarbonis*)RN12株及解壳聚糖松江菌(*Mitsuaria chitosanitabida*)XHY-A6株相似的胞外多糖生物合成途径、PrsK-PrsR双组分系统和PEP-CTERM胞外蛋白家族, 共同介导和调控的菌胶团形成机制。与后者相比, 菌株YN12中胞外多聚物(Extracellular polymeric substances, EPS)形成相关基因集中在大小约为72 kb的大型基因簇上, 且能吸收利用的碳源特别是单糖、二糖和多糖更为丰富多样。同时, 我们还从河流及养殖水体中也分离到象牙白伪杜榭氏菌, 这些菌株可用于生物絮团技术(Biofloc Technology), 改善水产养殖水质。

关键词: 伪杜榭氏菌属; 菌胶团形成; 胞外多聚物; 活性污泥; 全基因组; 生物絮团技术

中图分类号: Q938.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2020)03-0655-08

活性污泥技术距今约有百年历史, 广泛应用于市政污水和工业废水处理。活性污泥法主要是通过曝气促进微生物的代谢及生长, 活性污泥可通过重力作用实现泥水分离, 加之污泥回流以维持曝气池中微生物的浓度, 即所谓的活性污泥法三要素^[1]。活性污泥微生物菌胶团的形成有利于污泥的沉降和回用, 是该技术成败的关键, 微生物所分泌的胶质状由胞外多糖、蛋白质和核酸等生物大分子物质组成的胞外多聚物(简称EPS)是菌胶团形成的基础^[1,2]。

在活性污泥微生物菌群中, 动胶菌属(*Zoogloea*)是活性污泥中的优势菌群, 是菌胶团形成的代表性微生物, 本实验室已对其菌胶团形成机制进行了相关的研究报道^[3-7]。本次从云南省泸西县污水处理厂水样中分离到一株伪杜榭氏菌, 编号YN12, 发现该菌株能够形成稳定的菌胶团。

迄今为止, 伪杜榭氏菌属仅有3个已知物种且

均从不同生境中分离。李文均等^[8]从森林土壤中分离的紫黑伪杜榭氏菌(*Pseudoduganella violaceinigra*)YIM 31327^T是该属的模式种, 因该菌与杜榭氏菌(*Duganella zoogloeoidea*)IAM 12670^T具有较近的亲缘关系, 故发现之初被分类定名为紫黑杜榭氏菌(*D. violaceinigra*)。2012年, 该菌被重新分类、定义为新属伪杜榭氏菌属(*Pseudoduganella*)^[9]。随后, 从斑马鱼体内和泻湖沉积物中分别分离到呈米黄色的斑马鱼伪杜榭氏菌(*P. danionis*)E3/2^{T[10]}和象牙白伪杜榭氏菌(*P. eburnea*)10R5-21^{T[11]}。本次分离的伪杜榭氏菌YN12株经16S rDNA序列分析鉴定与*P. eburnea* 10R5-21^T具有较高的同源性, 通过基因组测序、组装和注释, 发现该菌具有与喜树脂动胶菌(*Z. ramigera*)MMB株、解叔丁醇水居菌(*Aquicola tertiaricarbonis*)RN12株以及解壳聚糖松江菌(*Mitsuaria chitosanitabida*)XHY-A6株相似的菌胶

收稿日期: 2019-10-22; 修订日期: 2020-03-14

基金项目: 中国科学院先导项目“美丽中国”子课题(XDA23040401); 中国科学院重点部署项目(KFZD-SW-219-3-2)资助 [Supported by Strategic Priority Research Program of CAS (XDA23040401); Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences Grant (KFZD-SW-219-3-2)]

作者简介: 刘亚琦(1995—), 女, 硕士研究生; 主要从事分子微生物学与生物技术研究。E-mail: liuyaqi@ihb.ac.cn

通信作者: 邱东茹(1968—), 男, 研究员; 博士生导师; 主要从事分子微生物学与生物技术研究。E-mail: qiu@ihb.ac.cn

团形成相关基因及基因簇^[2, 6, 7, 12]。我们还从中国科学院水生生物研究所石首养殖池塘中和安徽阜阳六里河中分离到同种菌株, 也能形成稳定的生物絮团, 说明该菌分布广泛, 加之所能利用的碳源比较多且基因组中含有氮代谢相关基因, 这种细菌可能适合用于以色列学者Avnimelech提出的生物絮团技术(Biofloc Technology)中, 用来调控生物絮团的微生物群落组成, 降低养殖水体中的氨氮含量, 以净化养殖水质、达到养殖动物最佳健康状态^[13-15]。

1 材料与方法

1.1 菌胶团/生物絮团形成菌的分离纯化

将从云南省泸西县污水处理厂采集的污泥样品和水样充分混匀, 用R₂A液体培养基进行10⁻³—10⁻⁶倍梯度稀释(每个梯度3个重复), 将稀释液均匀涂布到R₂A固体培养基上, 放入28℃培养箱中培养24—36h。从平板上挑取不同颜色、形态的菌落接种至R₂A液体培养基中, 振荡培养(28℃, 220 r/min), 筛选菌胶团形成稳定的菌株并进行多次分离纯化, 以获得纯培养物。挑取纯培养物的单克隆摇菌, 用40%甘油按体积比1:1保存菌种, 于-80℃冷冻保藏备用。

1.2 菌株的分子鉴定

以细菌基因组为模板, 利用16S rDNA通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')扩增16S rDNA片段。PCR反应条件为: 95℃预变性5min; 95℃变性30s, 55℃退火45s, 72℃延伸1min, 30个循环; 72℃延伸10min; 16℃保温。

扩增产物经纯化后与pMD18-T载体连接, 并通过热激转化的方法转入到大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞中, 经37℃复苏后涂布到含氨苄青霉素的LB固体板上置于37℃培养箱培养。用引物M13(-47) 5'-CGCCAGGGTTTCCCACTCACG-AC-3', M13(-48) 5'-GAGCGGATAACAATTCACACAGG-3'对阳性克隆进行菌落PCR扩增检测, 选取扩增片段大小正确的克隆送至测序公司完成测序。测序结果在GenBank上进行BLAST比对, 获得亲缘关系相近菌株的16S rDNA序列, 利用MEGA X软件, 通过邻接法(Neighbor-Joining method)构建系统发育树。

1.3 菌株YN12基于BioLog GEN III微孔板鉴定的碳源利用

将筛选获得的菌胶团形成稳定的菌株YN12在R₂A固体板上划线, 28℃培养箱培养1—2d, 用无菌棉签挑取少量菌落接种于BioLog GEN III专用接种

液IF-A中, 制备为均一菌悬液。先将菌悬液浓度调整至90%—98%T, 然后倒入V型加样水槽中, 再用8道移液器按每孔100 μ L的量将菌悬液按顺序加入GEN III微孔板的所有孔中, 放入28℃培养箱中培养36h, 用Omni Log读数仪读取数据。

1.4 基因组测序拼接及注释

用苯酚抽提法提取基因组, 经NanoDrop8000超微量紫外分光光度计及1%琼脂糖凝胶电泳进行浓度及质量测定, 待检测合格后, 送至公司进行二代全基因组测序, 测序结果利用本实验室已有的SPAdes基因组拼接工具对测序结果进行组装, 并通过RAST (Rapid Annotation using Subsystems Technology)基因组自动注释服务器进行注释。

2 结果

2.1 菌胶团形成菌表型的筛选

我们从云南省泸西县污水处理厂采集的活性污泥样品及水样中分离并纯化到一株菌胶团形成菌YN12(图1)。经16S rDNA序列分析鉴定为伪杜榭氏菌属细菌。与从云南森林土壤中分离的紫黑伪杜榭氏菌不同的是, YN12并不产色素, 液体培养基中形成的菌胶团和固体培养基上形成的菌落都呈白色, 与从泻湖沉积物中分离的象牙白伪杜榭氏菌在颜色及16S rDNA序列同源性上都更为接近, 故将菌株YN12鉴定为*Pseudoduganella eburnea*。

2.2 菌株YN12基于16S rDNA序列的系统发育进化树分析

将16S rDNA序列的测序结果在BLAST上进行比对发现, 菌株YN12与*P. eburnea* 10R5-21^T和*P. violaceinigra* YIM 31327^T的相似度分别为98.8%和98.5%。将亲缘关系相近菌株的16S rDNA序列在MEGA X软件中通过邻接法(NJ法)进行比对时发现(图2), 在同属菌株中, 菌株YN12与伪杜榭氏菌YIM 31327^T株和10R5-21^T株亲缘关系更近, 与*P. danionis* E3/2^T在序列及颜色上都有差异, 亲缘关系相对较远。伪杜榭氏菌属与杜榭氏菌属(*Duganella*)和马赛氏菌属(*Massilia*)同属于伯克霍德氏菌目(Burkholderiales)草酸杆菌科(Oxalobacteraceae), 三者之间存在较近的亲缘关系, 与红环菌目(Rhodocyclales)的动胶菌属亲缘关系相对较远。

2.3 象牙白伪杜榭氏菌YN12基因组的组装与注释

采用苯酚氯仿抽提法提取*P. eburnea* YN12基因组, 送至公司进行全基因组测序。利用RAST自动注释服务器注释后显示(表1), 菌株YN12基因组的大小约为5933582 bp, G+C含量为63.9%, 与*P. eburnea* 10R5-21^T株相接近, 含有104个RNA, 包含

5313个蛋白质编码序列, 其编码的蛋白按照功能可分为以下几类(图 3): 辅因子、维生素、辅基和色素相关(278个基因, 占5.23%), 细胞壁和荚膜形成相

关(126, 2.37%), 毒素、感染和防护相关(122, 2.30%), 钾离子代谢相关(16, 0.30%), 多种功能相关(43, 0.81%), 噬菌体、前噬菌体、转座因子和质粒相关(1,



图 1 *Pseudoduganella eburnea* YN12菌胶团形成表型及显微镜图

Fig. 1 Floc-forming phenotype and microscopical observation of *P. eburnea* YN12 strain

A为振荡培养时菌株YN12的表型; B为菌株YN12静置后沉淀的菌胶团; C为YN12在普通光学显微镜下的表型, 亚甲基蓝染色; D是用微分干涉显微镜拍摄的菌株YN12; 显微镜照片标尺均为10 μ m

A. Agitated bacterial cultures of strain YN12; B. Settled bacterial cultures of strain YN12; C. Microscope image of methylene blue staining of strain YN12; D. Photographed with differential interference microscope of strain YN12; Bars: 10 μ m

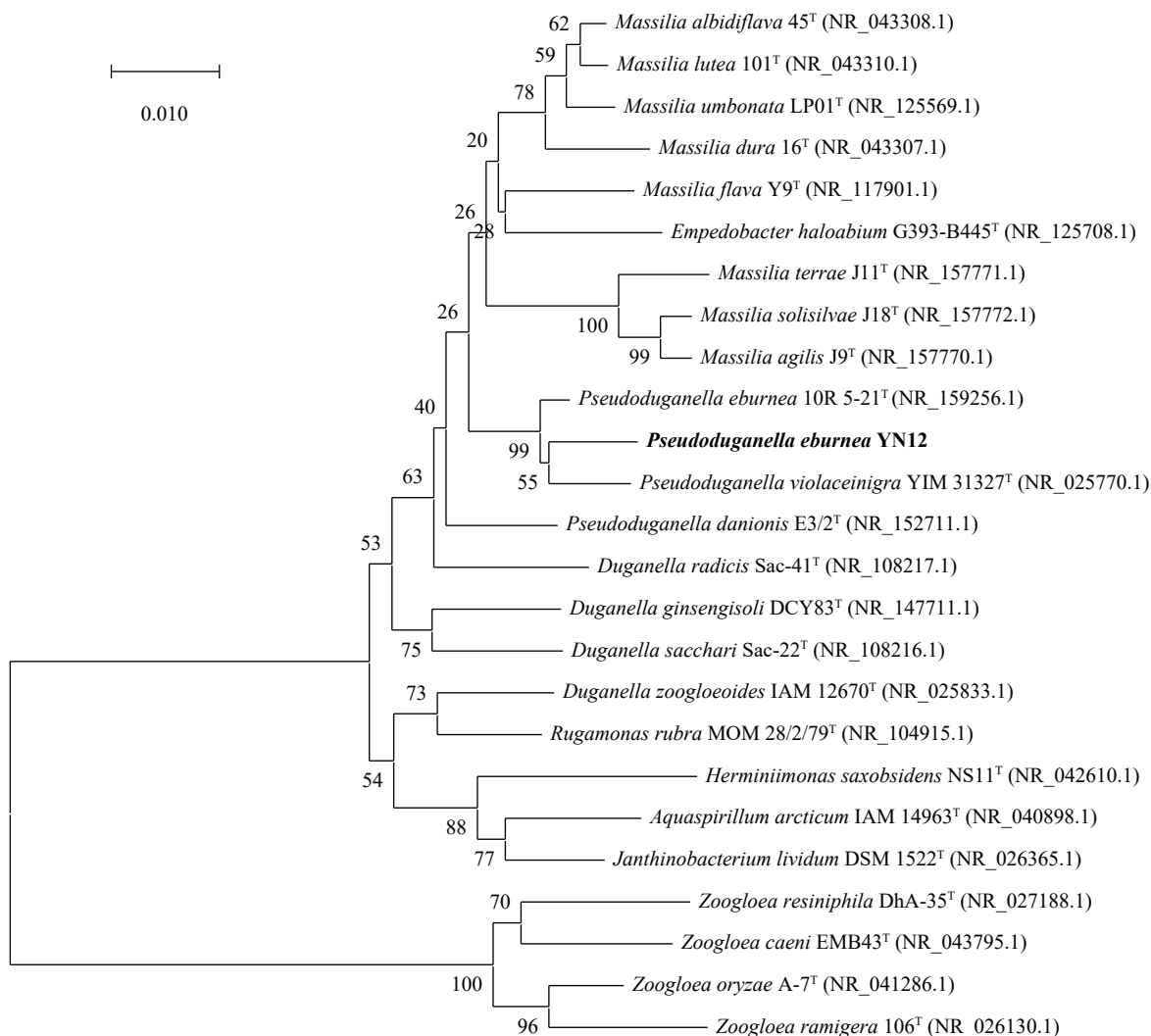


图 2 *Pseudoduganella eburnea* YN12及近缘细菌基于16S rDNA序列的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of *Pseudoduganella eburnea* YN12 and closely related strains

表 1 基因组信息统计

Tab. 1 Genomic information statistics

版本信息Version	<i>P. eburnea</i> YN12
基因组大小Genome size (bp)	5933582
G+C含量GC content (%)	63.9
Scaffold N50长度Length of scaffold N50 (bp)	451172
基因组L50 Genome L50	5
序列重叠群数目Number of contigs with PEGs	81
子系统数Number of subsystems	465
蛋白质编码序列Number of coding sequences	5313
RNA数目Number of RNAs	104

0.02%), 膜转运相关(296, 5.57%), 铁离子摄取与代谢类相关(59, 1.11%), RNA代谢相关(184, 3.46%), 核苷与核苷酸相关(116, 2.18%), 蛋白质代谢相关(300, 5.65%), 细胞分裂周期相关(37, 0.70%), 运动性和趋化性相关(227, 4.27%), 细胞调控和信号转导相关(49, 0.92%), 次级代谢相关(8, 0.15%), DNA代谢相关(113, 2.13%), 脂肪酸、脂肪和类异戊二烯相关(135, 2.54%), 氮代谢相关(49, 0.92%), 休眠和孢子形成相关(4, 0.08%), 呼吸作用相关(131, 2.47%),

应激反应相关(194, 3.65%), 芳香化合物代谢相关(24, 0.45%), 氨基酸及其衍生物相关(436, 8.21%), 硫代谢相关(33, 0.62%), 磷代谢相关(48, 0.90%), 碳水化合物相关(323, 6.08%), 功能未知(1961, 36.91%)。

2.4 菌株YN12基于基因组分析的胞外多聚物合成相关基因簇及相关基因编码产物间的比对

象牙白伪杜拉氏菌YN12基因组中存在与喜树脂动胶菌MMB^[6, 7]、解叔丁醇水居菌RN12^[12]及解壳聚糖松江菌XHY-A6^[2]相似的胞外多糖生物合成途径、PrsK-PrsR双组分系统和PEP-CTERM胞外蛋白家族, 共同介导和调控了菌胶团的形成。与后者相比, 菌株YN12的胞外多糖与蛋白质合成相关基因分布更为集中, 主要分布在大小约为72 kb的大型基因簇上, 包含已报道的天冬酰胺合成酶基因asnB和asnH、多个糖基转移酶基因、葡萄糖醛酸表型异构基因uge, 双组分系统相关基因prsR-prsK, 糖基转移酶基因epsB2等与菌胶团形成相关的基因。

与菌株MMB胞外多聚物相关基因簇相比, YN12中含有两个prsT相关基因, 且两个相关基因

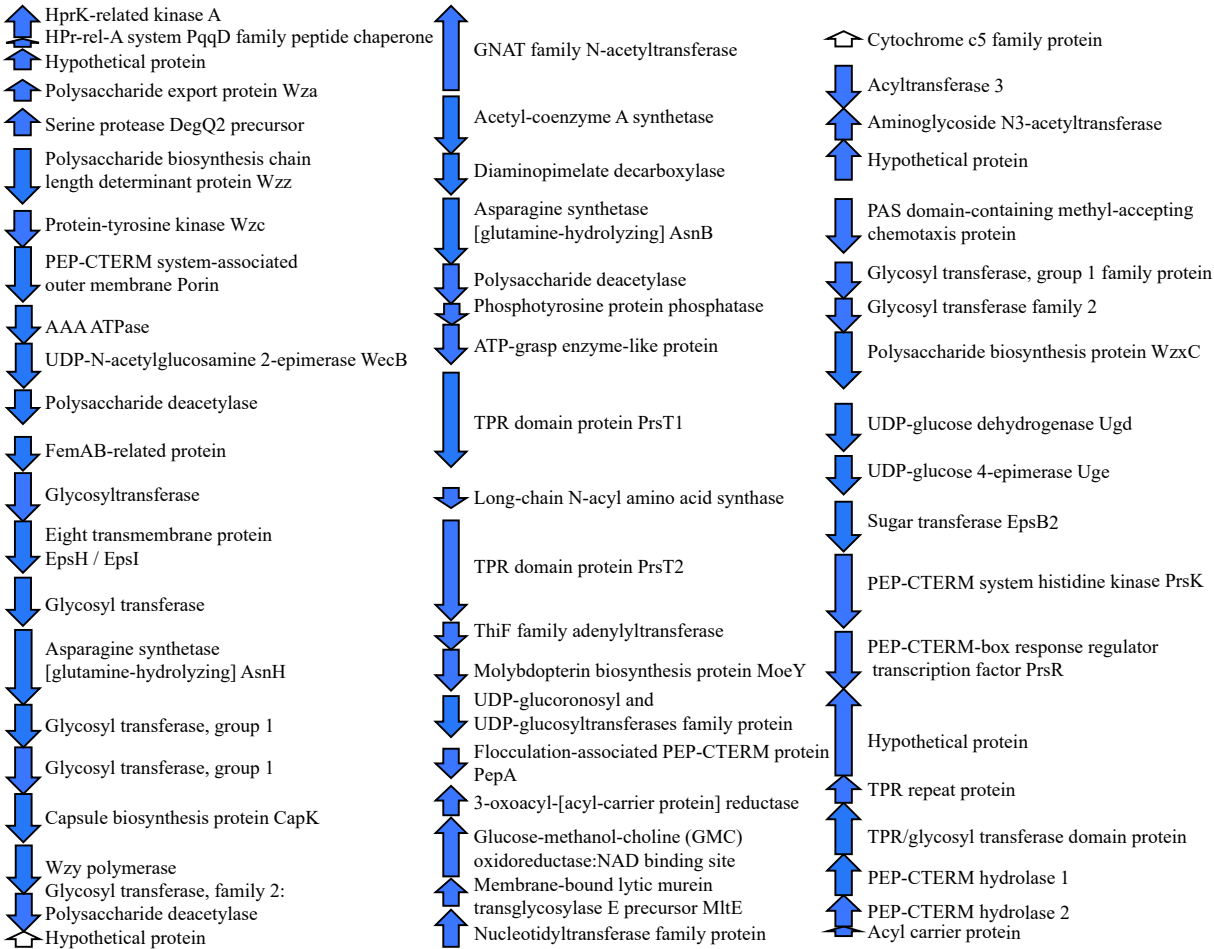


图 3 *Pseudoduganella eburnea* YN12胞外多聚物形成相关基因簇
Fig. 3 The extracellular polymeric substances biosynthesis gene cluster of *P. eburnea* YN12

与MMB中同源基因编码产物的相似度均为33% (表 2)。多糖脱乙酰酶(Polysaccharide deacetylase)、荚膜合成蛋白CapK、天冬酰胺合成酶AsnH、多糖输出蛋白Wza、转录调节因子PrsR以及尿苷二磷酸葡萄糖脱氢酶Ugd等直系同源基因表达产物的相似度均在50%左右, 序列相对较保守。这些结果说明虽然这两个菌株分属Beta变形菌纲的两个不同的目, 但是胞外多糖、胞外多聚物和菌胶团/生物絮团形成的分子机制非常相似。

2.5 菌株YN12与其他菌胶团形成菌的碳源利用比较及比较基因组学分析

细菌通常可以利用多种碳源, 包括有机污染物, 是细菌净化水质的重要基础。BioLog自动微生物鉴定系统可以从侧面提供细菌代谢生理比较分析和亲缘关系鉴定的依据。将*P. eburnea* YN12微孔板的鉴定结果与已知的杜辮氏菌进行比对, 在碳源利用方面(表 1), 菌株YN12与*P. violaceinigra* YIM 31327^T和*P. eburnean* 10R5-21^T都可以利用葡萄糖、麦芽糖、纤维二糖、蔗糖、N-乙酰基葡萄糖胺等作为唯一碳源, 也可以利用组氨酸、丝氨酸等氨基酸, 但都不能利用岩藻糖、鼠李糖、山梨醇及柠檬酸。

通过对*P. eburnea* YN12基因组分析发现, 该菌拥有完整的三羧酸循环和乙醛酸支路、磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway)和微生物特有的Entner-Doudoroff途径。还拥有乳糖、果糖、甘露糖和蔗糖的吸收和降解相关基因, 与BioLog分析结果相吻合。

将*P. eburnea* YN12的基因组与用同种方法注释的*P. violaceinigra* YIM 31327^T基因组进行比对后

发现, 菌株YN12基因组中含有N-乙酰D-氨基葡萄糖运输系统, 半乳糖、N-乙酰D-氨基半乳糖、甘露糖、D-半乳糖酸、D-葡萄糖酸、D-甘油、聚羟基丁酸酯、甘油酯和甘油磷脂等分解代谢相关基因, 具有谷氨酸转运系统渗透酶蛋白GltI、GltK、GltJ和脯氨酸代谢相关蛋白的编码序列。在碳源利用方面, 菌株YN12能利用的碳源更为丰富。

与菌株MMB相比, YN12基因组中含有脯氨酸、4-羟脯氨酸、组氨酸、赖氨酸降解相关基因, 甲壳素、N-乙酰氨基葡萄糖、N-乙酰半乳糖胺、半乳糖胺、D-半乳糖酸、D-葡萄糖酸、甘油、半乳糖、蔗糖等分解代谢相关基因, 拥有谷胱甘肽的生物合成和谷氨酰胺循环相关基因。而MMB基因组中含有的乳酸、尿素、苯甲酸分解基因, 辅酶B12、氰钴胺素合成相关基因, 铬酸盐抗性蛋白ChrB、多重耐药蛋白MarC、汞转运蛋白MerT、蛋白质加工修饰的G3E蛋白家族、CRISPR相关蛋白的编码序列, 具有维生素B6降解途径, 4-羟基苯乙酸分解代谢途径, 酮己二酸途径的儿茶酚分支等。相对而言, 菌株YN12在多糖利用方面较菌株MMB更为丰富, 可以利用淀粉(糊精)、几丁质及果胶等植物来源的大分子物质。而后者对脂肪酸和酯的利用能力较强, 与BioLog分析结果相符合。

2.6 不同水体中伪杜辮氏菌属细菌的筛选

我们从安徽省阜阳市六里河和中国科学院水生生物研究所石首养殖基地水样中分离到伪杜辮氏菌属菌株F1和SS14, 16S rDNA序列鉴定分析结果显示, 与*P. eburnean* 10R5-21^T相似度分别为99.4%和99.6%。平板培养的菌落及液体培养中形成的菌

表 2 *Pseudoduganella eburnea* YN12与喜树脂动胶菌MMB中EPS合成相关基因簇表达产物的序列相似性

Tab. 2 The gene products of the extracellular polymeric substances (EPS) biosynthesis gene cluster of *Pseudoduganella eburnea* YN12 strain and the predicted orthologues in the closely related proteobacterial genomes (the polypeptide sequence identity was shown)

蛋白 Protein	预测功能Predicted function	<i>Zoogloea resiniphila</i> MMB	蛋白Protein	预测功能Predictedfunction	<i>Zoogloea resiniphila</i> MMB
Wzc	EPS chain length determinant	48%	FemAB-like protein	Unknown	49%
AsnB	Asparagine biosynthesis	44%	Wzy polymerase	EPS unit polymerization	44%
MltE	Soluble lytic murein transglycosylases	42%	AAA ATPase	EPS export	46%
CapK	Unknown	55%	Polysaccharide deacetylase	Removal of acetyl group from EPS	57%
EpsH	Transmembrane protein involved in EPS biosynthesis	32%	DegQ2	Periplasmic serine protease	43%
AsnH	Asparagine biosynthesis	66%	Wzx	Flipping ofEPS units	21%
Wzz	EPS chain length determinant	43%	Outer membranePorin	EPS export	22%
Wza	EPS export	58%	Ugd	UDP-glucose dehydrogenase	71%
EpsB2	PEP-CTERM system associated sugar transferase	44%	Uge	Synthesis of UDP-D-galacturonate	22%
PrsR	PEP-CTERM box response regulator	66%	PrsK	PutativePEP-CTERM system histidine kinase	42%
PrsT	Putative PEP-CTERM system TPR-repeat lipoprotein	33%	Diaminopimelate decarboxylase	Lysine biosynthesis	63%

胶团均为白色(图 4)。与菌株YN12相同,三者在R₂A液体培养基中均能形成稳定的菌胶团(生物絮团)。

生物絮团技术是近年来水产养殖中用以调控水质的新型养殖模式,但难以控制生物絮团中群落组成是目前存在的问题^[16]。喜树脂动胶菌MMB株分离于活性污泥中,不能利用葡萄糖及多种单糖、淀粉和纤维素。与之相比,象牙白伪杜辚氏菌不仅分布范围更为广泛,我们从云南泸西、湖北石首和安徽阜阳均分离到该种生物絮团形成菌,且利用的碳水化合物种类较前者更为丰富(表 3),在养殖水体中,可以更好的吸收利用生物絮团技术中常用的淀粉等碳源,更有利于其存活和促进生物絮团的形成。

3 讨论

我们从云南省泸西县污水处理厂的活性污泥水样中分离到一株菌胶团形成菌YN12,经16S rDNA序列分析鉴定与*P. eburnean* 10R5-21^T株亲缘关系最近。通过全基因组测序发现,菌株YN12的基因组大小约为5934 kb, G+C含量为63.9%,包含5313个编码序列,含有与喜树脂动胶菌MMB株、解叔丁醇水居菌RN12株及解壳聚糖松江菌XHY-A6株等菌胶团(生物絮团)形成菌相似的胞外聚合物合成相关基因簇。

近年来,在水产养殖中用以调控水质的新型养

殖模式生物絮团技术主要通过添加不同碳源调控水体中的碳氮比,而施用生物絮团形成菌或丝状菌直接调控生物絮团的微生物组成和结构相关研究鲜少报道。该技术目前存在着难以控制生物絮团中菌群组成的问题^[16]。为解决这一问题,中国科学院水生生物研究所研究人员将我们所分离的活性污泥菌胶团形成菌喜树脂动胶菌MMB株接种到鱼类养殖试验池中,结果发现该菌未能在养殖池中大量繁殖^[17]。我们认为很可能是所添加的碳源不能被该菌吸收利用进行生长的缘故。

菌株YN12相比于喜树脂动胶菌MMB和解叔丁醇水居菌RN12,所能吸收利用碳源特别是单糖、二糖和多糖更为丰富多样(表 1),除了淀粉(糊精)以外,该菌可以利用纤维二糖、龙胆二糖、蔗糖、甘露糖、半乳糖、几丁质(壳聚糖)单体N-乙酰-D-葡萄糖胺、N-乙酰-D-半乳糖胺等作为唯一碳源,还可以利用果胶等植物来源的大分子多糖。此外,从菌株YN12基因组注释结果中发现,该菌拥有铵转运体(Ammonium transporter)和谷氨酸和谷酰胺合成酶(Glutamate synthetase and glutamine synthetase)基因,说明该菌可以吸收利用养殖水体中高浓度的铵离子并用来合成氨基酸和蛋白质,进而形成生物絮团被鱼类滤食、消化和吸收利用。同时,我们从石首水产养殖水体和阜阳河流中也分离到象牙白伪杜辚氏菌SS14和F1菌株。因此菌株

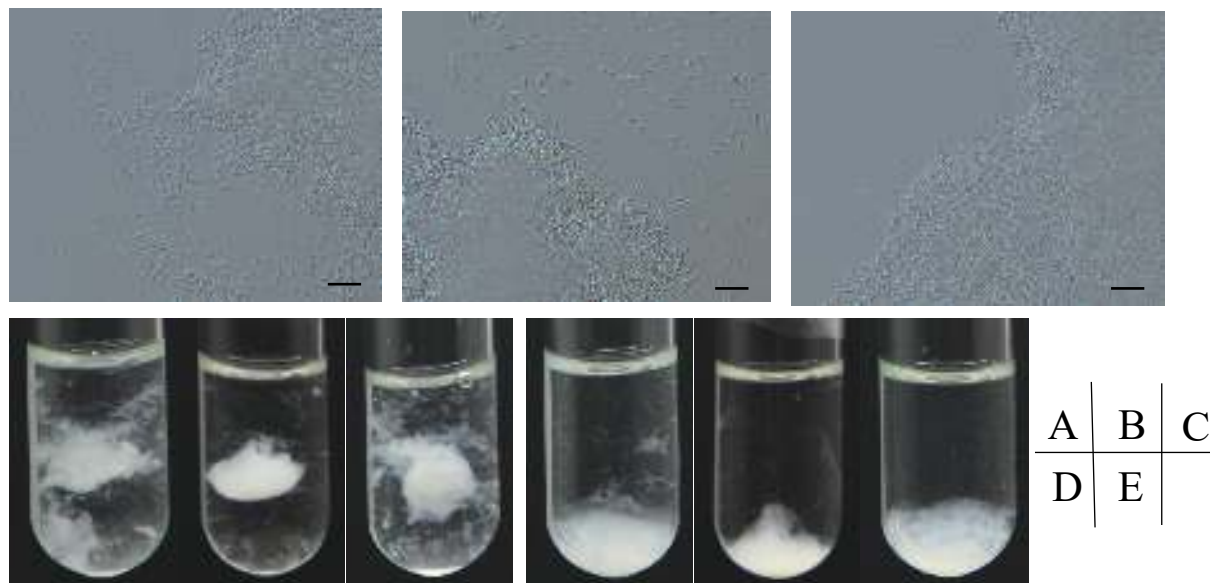


图 4 从不同水体中分离纯化的象牙白伪杜辚氏菌菌胶团形成表型及显微镜图

Fig. 4 Floc-forming phenotype and microscopic observation of the *Pseudoduganella eburnean* strains isolated from different water bodies A、B、C分别为菌株YN12、F1、SS14用微分干涉显微镜拍摄的照片; D、E从左至右依次为菌株YN12、F1、SS14; D为各菌株振荡时表型; E为各菌株静置后表型; 标尺为10 μm

Panel A, B and C were the YN12, F1 and SS14 strains photographed with differential interference microscope, respectively; Panel D. Agitated bacterial cultures from panels A to C, from left to right; Panel E. Settled bacterial cultures from panels A to C, from left to right. Bars: 10 μm

表 3 *Pseudoduganella eburnea* YN12 基于 BioLog 结果的碳源利用Tab. 3 Utilization of carbon source based on BioLog results of *Pseudoduganella eburnea* YN12

碳源Carbon source	1	2	3	4	5	碳源Carbon source	1	2	3	4	5
糊精Dextrin	+	ND	ND	+	+	肌醇Myo-Inositol	+	-	-	-	-
麦芽糖D-Maltose	+	+	+	-	+	甘油Glycerol	-	ND	-	+	+
海藻糖D-Trehalose	-	ND	ND	-	-	明胶Gelatin	+	ND	ND	-	-
纤维二糖D-cellobiose	+	+	+	-	-	甘氨酸-L-脯氨酸Glycyl-L-proline	+	ND	ND	-	-
龙胆二糖Gentiobiose	+	ND	ND	-	-	L-丙氨酸L-alanine	-	+	-	+	+
蔗糖Sucrose	+	+	+	-	+	L-精氨酸L-Arginine	+	ND	ND	-	-
松二糖Turanose	-	ND	ND	-	-	L-天冬氨酸L-aspartic acid	+	-	-	+	+
水苏糖Stachyose	-	ND	ND	-	-	L-谷氨酸L-glutamic acid	+	-	-	+	+
棉子糖D-Raffinose	-	+	-	-	-	L-组氨酸L-Histidine	+	+	+	-	+
乳糖 α -D-Lactose	-	ND	ND	-	-	L-丝氨酸L-Serine	+	+	+	-	-
蜜二糖D-Melibiose	-	+	-	-	-	果胶Pectin	+	ND	ND	-	+
β -甲基-D-葡萄糖苷 β -Methyl-D-glucoside	-	ND	ND	-	+	葡萄糖D-Gluconic acid	-	ND	ND	-	+
水杨苷D-Salicin	-	-	+	-	-	苹果酸L-malic acid	+	ND	ND	+	+
N-乙酰-D-葡萄糖胺N-acetyl-D-glucosamine	+	ND	+	-	-	柠檬酸Citrate	-	-	-	-	+
N-乙酰-D-半乳糖胺N-acetyl-D-galactosamine	+	ND	ND	-	-	乳酸Lactic acid	-	+	-	+	+
葡萄糖 α -D-Glucose	+	+	+	-	+	吐温40 Tween 40	+	ND	ND	-	+
甘露糖D-Mannose	+	+	-	-	-	丁酸Butyric acids	+	ND	ND	+	+
果糖D-Fructose	+	-	-	-	+	丙酸Propionic acid	-	+	ND	-	-
半乳糖D-Galactose	+	ND	+	-	-	甲酸Formic acid	-	ND	ND	-	+
岩藻糖Fucose	-	-	-	-	-	乙酸Acetic acid	-	+	-	+	+
鼠李糖L-Rhamnose	-	-	-	-	-	乙酰乙酸Acetoacetic acid	-	ND	ND	-	+
肌苷Inosine	-	ND	ND	-	+	丙酮酸甲酯Methyl Pyruvate	-	ND	ND	+	+
山梨醇D-Sorbitol	-	-	-	-	+	羟基苯乙酸p-hydroxy-phenylacetic acid	-	ND	ND	+	+
甘露醇Mannitol	-	-	+	-	+	乳酸甲酯D-lactic acid methyl ester	-	ND	ND	+	+
阿拉伯醇D-Arabitol	-	ND	ND	-	+	α -酮戊二酸 α -Keto-glutaric acid	-	ND	ND	-	-

注: 1. 菌株*P. eburnea* YN12; 2. 菌株*P. eburnea* 10R5-21^[11]; 3. 菌株*P. violaceinigra* YIM 31327^[18]; 4. 菌株*Z. resiniphila* MMB^[6]; 5. 菌株*A. tertiaricarbonis* RN12^[12]。“+”表示可以利用;“-”表示不能利用,“ND”表示没有相关数据

Note: Strain: 1. *P. eburnea* YN12; 2. *P. eburnea* 10R5-21^[11]; 3. *P. violaceinigra* YIM 31327^[18]; 4. *Z. resiniphila* MMB^[6]; 5. *A. tertiaricarbonis* RN12^[12]. “+”, Positive reaction; “-”, Negative reaction; “ND”, No data available

YN12及其同种近缘菌株可能更适合应用于改善养殖水质的生物絮团技术中,可以加以利用来直接调控、促进生物絮团中菌群的组成,提高资源循环利用和水质净化功能,促进绿色养殖。

参考文献:

- [1] Qiu D R, Gao N, An W X, *et al.* Biosynthesis pathway of extracellular polymeric substance and regulatory mechanism underlying floc formation of activate [J]. *Microbiology China*, 2019, **46**(8): 2080-2089. [邱东茹, 高娜, 安卫星, 等. 活性污泥微生物胞外多聚物生物合成途径与菌胶团形成的调控机制 [J]. 微生物学通报, 2019, **46**(8): 2080-2089.]
- [2] Wang J, Gao N, Liu S Y, *et al.* Identification and analysis of a large gene cluster involved in floc formation of activated sludge bacterium *Mitsuaria chitosanitabida* [J]. *Microbiology China*, 2019, **46**(8): 1946-1953. [王晶, 高娜, 刘双元, 等. 活性污泥微生物解壳聚糖松江菌中菌胶团形成相关大型基因簇的鉴定和分析 [J]. 微生物学通报, 2019, **46**(8): 1946-1953.]
- [3] Dias F F, Bhat J V. Microbial ecology of activated sludge I. Dominant bacteria [J]. *Applied Microbiology*, 1964, **12**(5): 412-417.
- [4] Rossellomora R A, Wagner M, Amann R, *et al.* The abundance of *Zoogloea resiniphila* in sewage treatment plants [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(2): 702-707.
- [5] An W X, Gao N, Xia M, *et al.* Physiological characteristics and systematic classification of the *Zoogloea* species and their role in the activated sludge [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2016, **22**(6): 1167-1174. [安卫星, 高娜, 夏明, 等. 动胶菌属系统分类、生理特征及其在活性污泥中的作用 [J]. 应用与环境生物学报, 2016, **22**(6): 1167-1174.]
- [6] An W X, Guo F, Song Y L, *et al.* Comparative genomics analyses on EPS biosynthesis genes required for floc formation of *Zoogloea resiniphila* and other activated sludge bacteria [J]. *Water Research*, 2016, (102): 494-

- 504.
- [7] Gao N, Xia M, Dai J C, *et al.* Both widespread PEP-CTERM proteins and exopolysaccharides are required for floc formation of *Zoogloea resiniphila* and other activated sludge bacteria [J]. *Environmental Microbiology*, 2018, **20**(5): 1677-1692.
- [8] Li W J, Zhang Y Q, Park D J, *et al.* *Duganella violaceinigra* sp. nov., a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, **54**(4): 1811-1814.
- [9] Kampfer P, Wellner S, Lohse K, *et al.* *Duganella phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the leaf surface of *Trifolium repens* and proposal to reclassify *Duganella violaceinigra* into a novel genus as *Pseudoduganella violaceinigra* gen. nov., comb. nov [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, **35**(1): 19-23.
- [10] Kämpfer P, Irgang R, Busse H J, *et al.* *Pseudoduganella danionis* sp. nov., isolated from zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, **66**(11): 4671-4675.
- [11] Jin D H, Subhash Y, Lee S S. *Pseudoduganella eburnea* sp. nov., isolated from lagoon sediments [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, **67**(12): 5268-5272.
- [12] Yu D Z, Xia M, Zhang L P, *et al.* RpoN (sigma (54)) is required for floc formation but not for extracellular polysaccharide biosynthesis in a floc-forming *Aquicola tertiarycarbonis* strain [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, **83**(14): e00709-e00717.
- [13] Avnimelech Y. Carbon nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems [J]. *Aquaculture*, 1999, **176**(3-4): 227-235.
- [14] Azim M E, Little D C. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 2008, **283**(1-4): 29-35.
- [15] Kumar V S, Pandey P K, Anand T, *et al.* Biofloc improves water, effluent quality and growth parameters of *Penaeus vannamei* in an intensive culture system [J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, (215): 206-215.
- [16] Cardona E, Gueguen Y, Magre K, *et al.* Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system [J]. *BMC Microbiology*, 2016, **16**(1): 157.
- [17] Liu H K, Li H D, Wei H, *et al.* Biofloc formation improves water quality and fish yield in a freshwater pond aquaculture system [J]. *Aquaculture*, 2019, (506): 256-269.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND GENOMICS ANALYSIS OF ACTIVATED SLUDGE FLOC/BIOFLOC FORMING *PSEUDODUGANELLA* *EBURNEA* STRAINS

LIU Ya-Qi^{1,2}, LIU Shuang-Yuan^{2,3}, GAO Na^{2,3}, DAI Jing-Cheng^{2,3} and QIU Dong-Ru^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In activated sludge process the separation of sludge and water is achieved by gravity, and the floc-forming bacteria are predominated and play a central role in the water purification. In this study, a floc-forming bacterial strain YN12 was isolated from activated sludge of the municipal sewage treatment plant of Luxi County, Yunnan Province, and it was identified as *Pseudoduganella eburnea* and was phenotypically similar to the type strain 10R5-21^T. In order to reveal and compare the floc-forming mechanism and carbon source utilization of the strain YN12 with those of other floc-forming bacteria, the genome sequencing, assembly, annotation and comparative genomics analysis were conducted. The results showed that the genome size of *Pseudoduganella eburnea* YN12 was about 5934 kb, the G+C content was 63.9%, and it contained 5313 protein coding sequences. Comparative analyses revealed a similar floc-forming and regulation mechanism to *Zoogloea resiniphila* MMB, *Aquicola tertiarycarbonis* RN12 and *Mitsuaria chitosanitabida* XHY-A6, which involves the exopolysaccharide biosynthesis, PrsK-PrsR two-component system and PEP-CTERM domain containing protein family. Meanwhile, these genes involved in the synthesis of extracellular polymeric substances (EPS) were concentrated on a large gene cluster of about 72 kb in size, and the YN12 strain was more functionally diverse in the absorption and utilization of carbon sources, particularly monosaccharides, disaccharides and polysaccharides. Moreover, two other *Pseudoduganella eburnea* strains had also been isolated from a river and an aquaculture pond. It is suggested that these strains could also be utilized in biofloc technology to improve the water quality and nutrient recycling in aquaculture.

Key words: *Pseudoduganella*; Floc/biofloc formation; Extracellular polymeric substance; Activated sludge; Genome; Biofloc technology