

荧光原位杂交(FISH)技术在厌氧颗粒污泥研究中的应用

左剑恶, 杨 洋, 沈 平, 顾夏声

(清华大学环境科学与工程系, 厌氧生物实验室, 北京 100084)

摘 要: 本文介绍了荧光原位杂交(FISH)技术的基本原理和操作步骤, 重点介绍和讨论了 FISH 技术在厌氧颗粒污泥研究中的应用现状, 并对该技术在国内的应用前景进行了展望。

关键词: 颗粒污泥; 荧光原位杂交; 寡核苷酸探针; 厌氧生物技术

中图分类号: S216.4; X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1166(2004)01-0003-04

Application of Fluorescent In Situ Hybridization Technology in Study on Anaerobic Granular Sludge / ZUO Jian-e, YANG Yang, SHEN Ping, GU Xia-sheng / (Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 101084, P.R. China)

Abstract: In this paper, the basic principle and processes of Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) were introduced, then the application status of FISH in study on anaerobic granular sludge was strengthened. Finally, the future of this technology in China was expected.

Key words: Granular sludge; fluorescence in situ hybridization; Oligonucleotide probe; Anaerobic Biotechnology

厌氧颗粒污泥是由多种具有互营共生关系的厌氧微生物形成的复杂聚集体, 是 UASB, EGSB 和 IC 等厌氧反应器高效稳定运行的关键, 众多研究者对其形成机理、微观结构、微生态等进行了大量研究, 但基于纯培养的传统微生物学研究方法自身存在的缺陷、颗粒污泥中微生物组成及其相互关系的复杂性、以及某些厌氧细菌(如产氢产乙酸细菌和产甲烷细菌)的生长特异性等, 使得对厌氧颗粒污泥的认识至今仍未取得共识。

分子生物学技术以核酸分子(DNA 或 RNA)为研究对象, 可在无需纯培养和不扰动环境样品的情况下, 对样品中的微生物直接进行研究。荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)是目前应用广泛的一种分子生物学技术, 在对活性污泥、生物膜和厌氧颗粒污泥等的深入研究中发挥了重要作用。因此, 本文首先简要介绍 FISH 技术的基本原理和操作步骤, 然后重点介绍其在厌氧颗粒污泥研究中的应用现状, 并对这项技术在我国的应用前景进行了展望。

1 FISH 技术的基本原理

FISH 技术是利用一小段(通常 15~30 个碱基)用荧光物质标记过的 DNA 或 RNA 序列作为探针, 将其直接投加到环境样品中, 利用其与样品中同源性微生物细胞内核酸分子的碱基互补配对特性, 在荧

光显微镜下, 直接观察和探测特定微生物的分布与数量。1989 年, Delong^[1]第一次使用 FISH 技术对单个微生物细胞进行了检测, 随后 Amann^[2], Stahl^[3]等人利用该技术对多种环境样品进行了研究, 使该技术在环境领域内的应用日趋广泛和成熟。

FISH 技术的目标分子通常是 16S rRNA, 因为它在活性微生物体内具有较高拷贝数, 分布广泛、功能稳定, 而且它在系统发育上具有适当的保守性。根据待测微生物体内 16S rRNA 中的某段特异性序列, 设计相应的寡核苷酸探针, 就可实现对目标微生物的原位检测, 而选取在分子遗传性质上保守性不同的特异序列, 就可不同水平(如域、属、种……等)上进行检测。目前, 公共和商业数据库中已公布的 16S rRNA 序列逐渐增多, 因此, 以 16S rRNA 为目标的 FISH 技术的应用也越来越广泛, 对环境样品中微生物的原位研究也越来越方便和准确。除 16S rRNA 外, FISH 技术还可以 23S rRNA 或 mRNA 等作为研究的目标分子。

FISH 技术成功应用的关键在于设计和获得具有很高灵敏性和专一性的寡核苷酸探针, 探针的灵敏性是指可在皮克级(10^{-12} 克)或更低浓度下对目标分子进行检测; 而专一性则要求其只能特异性地与其具有同源性的序列片段发生反应, 而不与样品中存在的其它核酸或非核酸分子发生反应, 检测准确率高。此外, 由于是原位操作, 还要求探针能够顺利进

收稿日期: 2003-10-21

项目来源: 国家自然科学基金(50008009)和国家“863”计划课题(2002AA601190)联合资助

作者简介: 左剑恶, 男, 1968 年 5 月, 博士, 副教授, 主要研究方向为废水厌氧生物处理的理论与技术。

人受试微生物细胞内部。

探针上荧光物质的选择与标记也很重要。常见的是直接荧光标记法,即将荧光信号分子直接与探针的5'端或通过酶催化与3'端相连,当探针与目标序列杂交后可立即观察。直接标记法应用广泛,且方便快捷。有人还在探针的两端同时加上荧光标记,可获得更强的荧光信号^[4]。带有荧光标记的探针,可在暗处和-20℃的条件下保存数月。

FISH 技术的基本操作步骤主要有:

- (1) 固定与预处理:待测样品在处理后的载玻片上进行固定,有时需要进行一些特殊的预处理;
- (2) 杂交:加入探针进行杂交,一般用一种或多种探针同时进行杂交;
- (3) 洗脱:去除未杂交或非特异性杂交的探针;
- (4) 观察:将样品置于荧光显微镜下观察,记录结果,并对结果进行分析。

目前 FISH 技术已被广泛应用于对活性污泥和生物膜的研究中,如:污泥膨胀过程中特异性丝状菌的寻找与确定^[5,6]、硝化过程中氨氧化细菌和硝化细菌的数量分配与空间分布^[7]、以及生物强化除磷过程中放线菌和某种特异细菌的作用等^[8]。

2 FISH 在厌氧颗粒污泥研究中的应用

利用基于纯培养的传统微生物研究手段,及利用电子显微镜通过形态分辨来确定微生物种属的传统方法,研究厌氧颗粒污泥中微生物组成及空间分布存在着较大困难和明显不足。自然界中绝大多数微生物无法进行纯培养,因此,传统方法不能真实反映颗粒污泥的微生物组成^[2];而通过形态特征确定微生物种属的方法显然存在着更大的不确定性。FISH 技术的出现,可以在很大程度上弥补传统方法的不足。

利用 FISH 技术对颗粒污泥所进行的研究,主要集中在以下几个方面:1. 组成颗粒污泥的各种微生物的种属关系及其空间分布;2. 工艺或环境条件对颗粒污泥内部微生物空间分布的影响;3. 两种或多种特定微生物之间的生态关系等。

2.1 操作步骤

从处理装置或试验装置取出颗粒污泥,经沉淀和清水漂洗后,用多聚甲醛磷酸缓冲液进行固定,然后浸入熔化的塑化石蜡 (paraplast) 中,冷却后切片,切片厚度一般为 5~10 μm,将切片在 50℃ 水中进行延展后转移到玻片上,在 42℃ 条件下干燥后在二甲苯中浸泡 30 min,再用二甲苯-TBA-乙醇混合液进行冲洗,即完成了颗粒污泥样品的预处理。随后就

可按照上述 FISH 技术的基本操作步骤加入探针进行杂交、洗脱,最后在荧光显微镜下进行观察、照相和结果分析。

2.2 常用探针

在对颗粒污泥的研究中,需要应用多种探针,表 1 列出了其中常用的几种。

表 1 厌氧颗粒污泥研究常用探针

目标微生物	探针名称	探针序列(5'-3')	参考文献
所有微生物	UNIV1392	ACGGGCGGTGTCTGTRC	[9]
所有真细菌	EUB338	GCTGCTCCCGTAGGACT	[10]
α 蛋白细菌	ALF1B	CGTTGG(C/T)TCTGAGCCAG	
β 蛋白细菌	BET42a	GCCTTCCCACTTCGTTT	
	LDI23a	CTCTGCGCGCAGCT	[9]
γ 蛋白细菌	GAM42a	GCCTTCCCACTTCGTTT	[10]
脱硫叶菌属	D660	GAATTCACATTTCGCTCTG	[11]
所有古细菌	ARCH915	GTGCTCCCGCCCAATTCCT	[3]
产甲烷细菌	MG1200	CGGATAATTGCGGCATGCTG	[11]
产甲烷八叠球菌	MB1174	TACCGTCTGCACTCTCTCTC	
	MS1414	CTCACCCATACCTCACTCGGG	
髯毛甲烷菌属联合髯毛甲烷菌	MX825	TGCGACCGTGGCGGACACCTAGC	[11]
	MS1	CCGGATAAGTCTCTTGA	
	MS2	CTGAATGAGAGCGCTTCTTT	
	MS5	GGCCACGGGTGCGACCGTTGTCG	
	MX825(38)	TGCGAACCGTGGCGGACACCTAGC	[9]
巴氏甲烷八叠球菌	MB1	TTTGGTCAGTCTCTCCGG	
	MB3	CCAGACTTGGAAACCG	
	MB4	TTTATGCGTAAATGCAAT	
	MS821(38)	CGCATGCTGACACTAGGCCAGC	[12]
产甲烷丝菌	MT757	CCTAGCTTTCGTCCCTTG	

2.3 颗粒污泥中微生物组成及空间分布的研究

对于厌氧颗粒污泥结构方面的研究目前主要是根据颗粒污泥切片的扫描电镜照片来进行推测的,但是细菌本身的多态性就决定了这种方法存在明显的不足,而利用 FISH 技术可以在一定程度上真实的反映出颗粒污泥内部微生物的组成和空间分布情况。

Harmsen^[13]等人利用 EUB338、ARC915、MX825 和 MG1200 等探针的不同组合,在 45℃ 下与颗粒污泥切片杂交 3h,然后在 48℃ 下用杂交缓冲液清洗 30 min,最后经清水冲洗、风干后观察,发现蔗糖为基质的颗粒污泥分为三层:外层为真细菌,中间层为产氢产乙酸细菌与产甲烷丝菌的共生体,内层存在着较大空洞,有少量产甲烷细菌和无机物;而以混合挥发酸为基质的颗粒污泥只分为较明显的两层:外层是真细菌,内层则以产甲烷丝菌为主。

Sekiguchi 等人^[11]利用 EUB338 和 ARC915 探针确定了真细菌和古细菌在中温和高温厌氧颗粒污泥中的分布情况,然后利用 MX825、MG1200、MB1174,

MS1414 和 D660 等探针的不同组合对不同种类产甲烷细菌与真细菌的空间分布进行研究。结果表明,中温和高温颗粒污泥具有相似的微生物分布结构,外层主要是真细菌,内层主要是古细菌;颗粒中心均不能被染色,可能是无机物或死亡细菌;古细菌中以索氏产甲烷丝菌为主,在高温颗粒污泥中还存在少量的产甲烷八叠球菌;真细菌则种类较多,主要有脱硫叶菌、互营杆菌、和绿色非硫细菌等。

Tagawa 等人^[12]利用 ARC915, MB1174 和 MT757 等探针,采用计数法描述了颗粒污泥中古细菌、产甲烷丝菌和产甲烷八叠球菌的丰度。首先用联咪二苯吡啶(DAPI)对样品染色,在 372 nm 波长下观察并对细菌总量计数;再加入用诸丹明(rhodamine)标记的各种探针,在 554 nm 波长下计数,结果表明:古细菌是颗粒污泥中的优势菌群,占细菌总数的 28% ~ 53%;古细菌中产甲烷丝菌和产甲烷八叠球菌是主要代表,分别占细菌总数的 13% ~ 38% 和 4% ~ 27%。

此外,Saiki 等^[14]的研究表明某种产甲烷丝状菌主要分布在颗粒污泥的表面;Syutsubo 等^[15]则研究了进水基质对高温 UASB 反应器中颗粒污泥微生物群落动态变化的影响;Liu 等^[16]在研究处理酿酒废水的颗粒污泥内部结构时发现,颗粒污泥由水解梭状菌属和嗜氢产甲烷菌以及嗜氢产甲烷杆菌和嗜乙酸产甲烷丝菌组成明显的层状结构。

2.4 特殊菌种的研究

丙酸积累是造成厌氧反应器运行失败的主要原因,因此,颗粒污泥中丙酸降解菌的生长特性、空间分布以及生态定位已成为厌氧领域中的研究热点。Imachi 等^[17]从高温颗粒污泥中分离出丙酸降解菌 SI,为了解其在颗粒污泥中的丰度和空间分布,专门设计了探针 TGP690,并结合 ARC915、EUB338 和 MB1174 等进行细菌计数,结果表明,呈短杆状的丙酸降解菌 SI 主要分布在颗粒污泥的内层和中部,约占细菌总数的 1.1%,与嗜氢产甲烷细菌生长紧密。Harmsen 等人^[18]利用 MPOB 和 KOPROP1 等探针对处理蔗糖和混合挥发酸两种颗粒污泥中的丙酸降解菌进行研究,结果发现,在以蔗糖为基质的颗粒污泥内部丙酸降解菌 MPOB 与多种产甲烷细菌共生在一起,而以混合挥发酸为基质的颗粒污泥呈明显层状分布,在较厚层的产甲烷细菌之下,MPOB 与产甲烷细菌共同形成了单独的一个薄层。

厌氧过程中,硫酸盐还原菌与产甲烷细菌存在着生存竞争,因此,硫酸盐还原菌也受到了较多的关

注。Schramm 等人^[18]利用 FISH 技术发现,即使在未检测到硫酸盐浓度降低的情况下,在污泥中也能检测到硫酸盐还原菌的存在;Santegoeds 等人^[19]利用 ARC915, SRB385, DSV698 和 DSS658 等探针发现,产甲烷菌主要分布在颗粒污泥的内部,而硫酸盐还原菌则分布在外层;Sekiguchi 等人^[11]也得到类似结论;Amann 等人^[2]的研究表明,形态差异明显的脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris*)和乙酸氧化脱硫单胞菌(*Desulfuromonas acetoxidans*) 在荧光显微镜下可以分辨得很清楚。

2.5 不足与展望

FISH 技术在厌氧颗粒污泥研究中的应用尚处在起步阶段,还存在着不足:厌氧细菌普遍存在的自发荧光现象及探针的特异性不足都可能导致试验结果的正偏差;而试验过程中杂交液渗透不充分、杂交后荧光标记见光褪色等则导致负偏差。

因此,FISH 技术作为一项新兴的研究手段和工具,还需要在以下几个方面进行加强和改进:

- (1) 优化杂交过程中的各种操作条件;
- (2) 开展探针标记技术的研究,提高探针灵敏度,完善荧光信号检测技术,可采用级联放大的酶联抗原抗体反应等技术来提高检测灵敏度;
- (3) 完善利用单拷贝、短片段探针的 FISH 技术;
- (4) 为了高频率的检测低于几个 kb 单拷贝的 DNA 序列,可采用在原位杂交前对靶 DNA 进行 PCR 扩增或直接用标记的核苷酸进行原位 PCR 扩增。

此外,还应该加强 FISH 技术与其它技术的联用:FISH 与流式细胞分析仪(flow cytometry)联用能形成一项快速高效对污泥中细菌群落自动分析的技术^[20];Orphan 等人^[21]利用 FISH 与次级离子质谱(SIMS)结合对厌氧条件下的甲烷氧化菌进行了鉴定;Lee 等人^[22]采用 FISH 与显微放射自显影技术研究生化物质在细胞内的合成、转移和转化等代谢过程;Sekiguchi^[11]等人利用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)与 FISH 技术得到了不同菌种在颗粒污泥内部成层分布的高清晰照片。

3 结语

FISH 技术是一项新兴有力的研究工具,为颗粒污泥的研究提供了一条便捷之路,并将为最终解释颗粒污泥的形成机理和在短时间内培养出高品质颗粒污泥作出贡献。国内在厌氧领域的理论研究和工程实践上都已取得很大成功,但与国际先进水平相比,还存在差距,FISH 技术及其它分子生物学技术的

引入,将为国内在厌氧领域的基础理论研究提供强有力的武器,同时也会促进工程实践的快速发展,对我国高浓度有机工业废水的污染控制作出贡献。

参考文献

- [1] DeLong E F, Wickham G S, Pace N R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells[J]. *Science*, 1989, 243:1360 ~ 1363.
- [2] Amann R, W Ludwig, K Schleifer. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation[J]. *Microbio. Rev.*, 1995, 59: 143 ~ 169;
- [3] Stahl D A. Application of phylogenetically - based probes to microbial ecology[J]. *Molecular Ecol.*, 1995, (4): 535 ~ 542;
- [4] Spear R N, Li S, Nordheim E V, Andrews J H. Quantitative imaging and statistical analysis of fluorescence in situ hybridization (FISH) of *Aureobasidium pullulans*[J]. *J. Microbiol. Methods*, 1999, 35:101 ~ 110;
- [5] Schuppler M, Wanger M, Soehn G, et al. In situ identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA - targeted oligonucleotide probes[J]. *Microbiology*, 1998, 144:249 ~ 259;
- [6] De Los Reyes, M Hernandez, L Raskin. Quantification of *Gordonia amarae* Strains in Foaming Activated Sludge and Anaerobic Digester Systems with Oligonucleotide Hybridization Probes[J]. *Appl. Environ. Microbio.* 1998, 64: 2503 ~ 2512;
- [7] Patrick D, Jean P D, Rene M, et al. Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics[J]. *Re/Views in Environ. Sci. & Bio/Tech.*, 2002, (1):39 ~ 49;
- [8] Wagner M R, Erhart W, Manz R, et al. Development of and rRNA - Targeted Oligonucleotide Probe Specific for the Genus *Actinobacter* and its Application for In Situ Monitoring in Activated Sludge[J]. *Appl. Environ. Microbio.*, 1994, 60:792 ~ 800;
- [9] Rocheleau S C, Greer J, Lawrence C, et al. Differentiation of *Methanosaeta concillii* and *Methanosarcina barkeri* in Anaerobic Mesophilic Granular Sludge by Fluorescent In Situ Hybridization and Confocal Scanning Laser Microscopy[J]. *Appl. Environ. Microbio.*, 1999, 65:2222 ~ 2229;
- [10] Bond P R, Erhart M, Wagner J, et al. Identification of Some of the Major Groups of Bacteria in Efficient and Nonefficient Biological Phosphorus Removal Activated Sludge Systems[J]. *Appl. Environ. Microbio.*, 1999, 65:4077 ~ 4084;
- [11] Sekiguchi Y Y, Kamagata K, akamura A, et al. Fluorescence In Situ Hybridization Using 16S rRNA - Targeted Oligonucleotides Reveals Localization of Methanogens and Selected Uncultured Bacteria in Mesophilic and Thermophilic Sludge Granules[J]. *Appl. Environ. Microbio.*, 1999, 65: 1280 ~ 1288;
- [12] Tagawa T, Syutsubo K, Sekiguchi Y, et al. Quantification of methanogen cell density in anaerobic granular sludge consortia by fluorescence in - situ hybridization[J]. *Wat. Sci. & Tech.*, 2000, 42(3):77 ~ 82;
- [13] Hermie J, M Hammen, Harry M P, et. al. Detection and Localization of Syntrophic Propionate - Oxidizing Bacteria in Granular Sludge by In Situ Hybridization Using 16S rRNA Based Oligonucleotide Probes[J]. *Appl. Environ. Microbio.*, 1996, 62:1656 ~ 1663;
- [14] Saiki Y, Iwabuchi C, Katami A, et al. Microbial analyses by fluorescence in situ hybridization of well - settled granular sludge in brewery wastewater treatment plants[J]. *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, 93(6):601 ~ 606;
- [15] Syutsub K, Sinthurat N, Ohashi A, et al. Population dynamics of anaerobic microbial consortia in thermophilic granular sludge in response to feed composition change[J]. *Wat. Sci. & Tech.*, 2001, 43(1):59 ~ 66;
- [16] Liu W T, Chan O C, Fang H P. Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater [J]. *Wat. Res.*, 2002, 36(7):1767 ~ 1775;
- [17] Imachi H Y, Sekiguchi Y, Kamagata A, et al. Cultivation and In Situ Detection of a Thermophilic Bacterium Capable of Oxidizing Propionate in Syntrophic Association with Hydrogenotrophic Methanogens in a Thermophilic Methanogenic Granular Sludge[J]. *Appl. Environ. Microbio.*, 2000, 66: 3608 ~ 3615.
- [18] Schramm A C, Santegoeds H, Nielsen H, et al. On the Occurrence of Anoxic Microniches, Denitrification, and Sulfate Reduction in Aerated Activated Sludge[J]. *Appl. Environ. Microbio.*, 1999, 65:4189 ~ 4196.
- [19] Cecilia M. Santegodes Lars R D, Gijis H, et al. Distribution of Sulfate-Reducing and Methanogenic Bacteria in Anaerobic Aggregates Determined by Microsensor and Molecular Analyses[J]. *Appl. Environ. Microbio.*, 1999, 65: 4618 ~ 4629.
- [20] Wallner G R, Erhart R A. Flow Cytometric Analysis of Activated Sludge with rRNA-Targeted Probes[J]. *Appl. Environ. Microbio.*, 1995, 61: 1859 ~ 1866.
- [21] Orphan V J, House C H, Hinrichs K U, et al. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments[J]. *Microbiology*, 2002, 99(11): 7663 ~ 7668;
- [22] Lee N P, Nielsen K H, Andreasen S, et al. Combination of Fluorescent In Situ Hybridization and Microautoradiography — a New Tool for Structure - Function Analyses in Microbial Ecology[J]. *Appl. Environ. Microbio.*, 1999, 65:1289 ~ 1297.