

张星, 林炜铁, 朱雅楠. 2009 FISH 技术定量解析亚硝酸盐氧化菌的条件优化 [J]. 环境科学学报, 29(4): 716-722

Zhang X, Lin W T, Zhu Y N. 2009 Optimization of FISH to detect nitrite-oxidizing bacteria quantitatively [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(4): 716-722

# FISH 技术定量解析亚硝酸盐氧化菌的条件优化

张星, 林炜铁\*, 朱雅楠

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

收稿日期: 2008-07-03 修回日期: 2008-09-22 录用日期: 2009-02-25

**摘要:** 利用基于亚硝酸盐氧化菌 (nitrite-oxidizing bacteria NOB) 16S rRNA 序列的荧光探针, 优化了针对亚硝酸盐氧化菌的 FISH 技术实验条件. 确定了 FISH 技术定量检测亚硝酸盐氧化菌的具体方法, 并优化了样品预处理的实验条件为热固定 2h, 4% 多聚甲醛固定 15min, 乙醇脱水 5min, 杂交过程的实验条件为杂交温度 46°C, 杂交时间 3h, 洗脱液中 NaCl 浓度为 60mmol L<sup>-1</sup>. 运用建立的 FISH 技术检测了 7d 内亚硝酸盐氧化菌菌群的丰度变化, 充分显示了荧光原位杂交技术 (Fluorescence in situ Hybridization FISH) 的快速定性定量检测优势.

**关键词:** 荧光原位杂交; 亚硝酸盐氧化菌; 优化

文章编号: 0253-2468(2009)04-716-07 中图分类号: X171 文献标识码: A

## Optimization of FISH to detect nitrite-oxidizing bacteria quantitatively

ZHANG Xing LIN Weitie\*, ZHU Yanan

College of bioscience and bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006

Received 3 July 2008; received in revised form 22 September 2008; accepted 25 February 2009

**Abstract** Experimental conditions of Fluorescence in situ Hybridization (FISH) for detecting nitrite-oxidizing bacteria (NOB) are optimized through orthogonal tests by using the common fluorescent probe based on the 16S rRNA sequence of nitrite-oxidizing bacteria. Our results showed that the optimal conditions for sample preparation were a heat fixing-time of 2 hours, 4% paraformaldehyde fixing-time of 15 minutes, and ethanol dehydration time of 5 minutes. The optimal conditions for detecting NOB consisted of a hybridization temperature of 46°C, hybridization time of 3 hours, and hybridization solution containing 60 mmol L<sup>-1</sup> NaCl. A specific procedure was established and used to detect the change in abundance of the nitrite-oxidizing bacteria community. Our results suggest FISH technology is a fast and accurate method for quantitative detection of environmental microorganisms.

**Keywords** fluorescence in situ hybridization; nitrite-oxidizing bacteria; optimization

### 1 引言 (Introduction)

亚硝酸盐氧化菌 (Nitrite-oxidizing bacteria, NOB) 又称为硝酸菌, 是硝化细菌的一大类, 能够将亚硝酸盐氧化为硝酸盐, 与氨氧化菌在废水处理中起着重要作用. 此外, 亚硝酸盐有毒, 主要由化肥、饲料、农药中的含氮化学物质在微生物作用下生成, 广泛存在于土壤、水域等环境中. 因此, NOB 对整个氮元素的循环以及环境中亚硝酸盐的去除都具有非常重要的意义. 建立高效定量检测 NOB 的方法不仅对研究废水处理系统中硝酸菌和氨氧化菌的数量、空间分布以及微生物在氮循环中所处的阶段有重要意义, 而且可对监测水质变化情况以及对

污染水域进行生物修复起到指导作用.

NOB 是一类生理上非常特殊的细菌, 不仅化能好氧自养而且生长缓慢, 世代周期长, 种类繁多, 易变异. 传统的研究方法要经过富集、分离、分类和鉴定步骤, 耗时长 (4~8 周), 经培养后得到的优势类群与样品真实情况常有差异, 而 FISH 技术的引入解决了上述困难. FISH (Fluorescence in situ Hybridization, 荧光原位杂交) 技术利用荧光标记过的特异性核苷酸探针与固定的组织或细胞中特定的核苷酸序列进行杂交, 可以对绝大多数微生物进行实时的定性及定量观测研究, 整个过程并不需要 DNA 或 RNA 的提纯、扩增等繁琐且易引起偏差的步骤, 实用性较强 (Amann *et al.*, 2001). Wagner 和

基金项目: 广东省农业科技攻关计划项目 (No. 2008B021000036)

Supported by the Agricultural Science and Technology Research Projects of Guangdong Province (No. 2008B021000036)

作者简介: 张星 (1985-), 女, E-mail: zxsu@gmail.com; \* 通讯作者 (责任作者), E-mail: wtlir@139.com

Biography: ZHANG Xing (1985-), female, E-mail: zxsu@gmail.com; \* Corresponding author, E-mail: wtlir@139.com

Bruce 等首先将 FISH 技术应用于硝化细菌检测, 并建立了一套较简便的硝化细菌 FISH 检测方法 (Wagner *et al.*, 1995, 1998; Bruce *et al.*, 1996, 1999). 2003 年有研究者对转盘式生物膜法水处理装置中的生物膜在脱氮菌的处理机能进行研究时, 应用 FISH 法对硝化菌进行了定量计数观测, 研究结果证明了定量研究的可行性 (Sato *et al.*, 2003). 国内对于 FISH 技术的应用远远落后于国外, 文献资料多集中于综述, 直到 2005 年才有文献对 FISH 技术在硝化细菌中的应用做了初步探讨 (张明, 2005). 近两年, FISH 技术在国内越来越广泛地应用于污水处理系统中硝化细菌的快速定性 (于仁成等, 2006; 曾薇等, 2006), 定量功能仍少见报道.

由于通用检测方法定量可靠性较低, 需针对某一种菌种优化其 FISH 实验条件, 才能得到较为可靠的定量结果. 本研究中以亚硝酸盐氧化菌 (Nitrite-oxidizing bacteria, NOB) 为研究对象, 拟建立并优化检测 NOB 的荧光原位杂交定量检测技术, 旨在使 NOB 的定性定量监测更快、更准确、更简便, 这对亚硝酸盐氧化菌的分布和数量研究具有实际指导意义.

## 2 材料和方法 (Materials and methods)

### 2.1 样品采集

亚硝酸盐氧化菌菌种是本实验室从富营养化水体中分离纯化得到的菌株 NOB-1014 将其按 1% (V/V) 的接种量接入 10L 气升式反应器内纯培养. 取适量 NOB 纯培养菌悬液, 静置使菌体沉淀, 换入等量新鲜培养基, 通入无菌空气活化 1~2d. 1L 活化培养基中含 0.5g NaNO<sub>2</sub>, 0.136g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.14g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.3g NaCl, 1.6g NaHCO<sub>3</sub>, 0.03g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. 将活化后的菌悬液用磷酸缓冲液 1× PBS 清洗 2~3 次后立即进行样品预处理.

### 2.2 探针的选用

选用根据亚硝酸盐氧化菌 16S rRNA 设计的通用探针 N II 3 (Bruce *et al.*, 1996), 并在 5' 端用 HEX 荧光标记, 序列为 5'-CCTGTGCTCCATGCTCCG-3'; 其竞争性探针 CN II 3 序列为 5'-CCTGTGCTCCAG-GCTCCG-3'. CN II 探针与 N II 探针同时使用, 以确保 N II 探针的特异性. 以上探针均由 Takara 公司合成.

### 2.3 FISH 定量检测亚硝酸盐氧化菌方法

2.3.1 玻片的处理 为提高样品固定效果常用的方法有硅化处理 and 明胶包被处理 2 种. 将玻片用热

肥皂水刷洗后放在 1% (质量分数) 盐酸中浸泡 24h, 去离子水洗 3~5 次, 分别用 2 种方法处理玻片, 比较固定效果.

2.3.2 样品的预处理 对于原位杂交, 样品的分散程度和固定于玻片上的方式对杂交结果是否可计数, 计数的准确度有非常重要的影响. 由于 NOB 菌体易成团生长, 稀释度和 pH 对其分散程度的影响较大, 分别考察稀释倍数为 10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup> 以及 10<sup>5</sup>, pH 值为 5.5、6.5、7.5 的菌体分散情况, 以确定菌体最佳分散条件.

在上述处理过的玻片上用油性笔描画出直径为 8mm 的封闭圆, 取 10μL 分散后的菌液涂至圆圈内. 分别用 3 种方法固定样品: 第 1 种为 46℃ 下热固定; 第 2 种为室温下 4% 多聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) 固定; 第 3 种为 4% PFA 固定后再热固定. 观察 3 种方法的固定效果.

2.3.3 杂交反应 在固定菌体的圆圈内加入杂交液 9.6μL, N II 3 和 CN II 3 探针分别 0.5μL, 加盖玻片, 放入不透光的湿润杂交盒内在 46℃ 下进行杂交反应. 杂交液的配制 (Lorenzen *et al.*, 1998; Damingues *et al.*, 2002): 0.01% SDS, 40% 去离子甲酰胺 (DAF), Tris-HCl (pH = 7.2) 20mmol L<sup>-1</sup>, NaCl 浓度为 900mmol L<sup>-1</sup>, pH = 7.2.

2.3.4 探针的清洗 杂交完毕后从杂交盒中取出载玻片, 用 48℃ 杂交洗脱液, dH<sub>2</sub>O 漂洗, 晾干. 洗脱液的配制 (Lorenzen *et al.*, 1998; Damingues *et al.*, 2002): 0.01% SDS, Tris-HCl (pH = 7.2) 20mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 5mmol L<sup>-1</sup>, NaCl 浓度由正交试验确定, pH = 7.2.

2.3.5 镜检和计数 样品在荧光显微镜下观察, 在 490nm 激发光激发下, 阳性为橙红色荧光, 每个样品视场数 FN 为 22. 每个视场观测 10 个视野并拍摄下来. 检测假阳性和假阴性时, 每个视野拍摄 2 张照片, 一张是在激发光下的荧光照片, 另一张为在不加激发光时的普通照片. 使用 OLYMPUS BX51 型荧光生物显微镜, 用 IPP (Image-Pro Plus) 软件对照片进行处理分析和计数. 样品中细菌丰度由公式 (1) 计算得出 (李艳娜等, 2007).

$$E = N \cdot A \cdot S_1 \cdot (S_2 \cdot V)^{-1} \quad (1)$$

式中,  $E$  为 NOB 丰度 (cells mL<sup>-1</sup>),  $A$  为视野中荧光细胞平均数,  $S_1$  为样品涂抹的面积 (mm<sup>2</sup>),  $S_2$  为视野面积 (mm<sup>2</sup>), 视场直径  $F = FN \cdot M_{ob}^{-1} = 22/20 = 1.1$  (mm), 视野面积  $S_2 = \pi \cdot (0.5 \cdot F)^2$ ,  $V$  为样品体

积 (mL),  $N$  为样品稀释倍数.

2.3.6 对照 设置阴性对照和阳性对照 (Lorenzen *et al.*, 1998): 阴性对照指杂交时不加探针, 其它步骤与实验均一样的对照; 阳性对照指非 NOB 样本进行相同处理的对照.

#### 2.4 FISH 实验条件优化

由于不同细菌和探针对于 FISH 实验条件要求不同, 故需优化 FISH 在检测 NOB 时的实验条件. 根据已知的文献报道 (张明, 2005; Amann *et al.*, 2001; 1990), 分别对玻片处理方法、样品固定方法进行了对比, 选定了较优的方法. 由于样本预处理和杂交过程对杂交结果有很大的影响, 故分别对样品预处理的条件和杂交的条件进行了优化.

2.4.1 样品预处理条件的优化 样品预处理中, 热固定时间的长短会影响样品与明胶的黏附效果. 若黏附效果差, 则大量细胞在之后处理步骤中流失, 严重影响检测结果的准确性. 4% 多聚甲醛 (PFA) 固定时间太短不能很好的保持细胞内的 RNA, 但过度延长固定时间会引起细胞内生物大分子的过度交联, 影响探针的穿透力, 降低杂交效率. 乙醇梯度脱水的时间长短会影响细胞的形态和收缩性, 从而影响探针进入细胞的能力, 进而影响杂交效率. 因此, 利用正交试验选取最优样品预处理条件, 根据文献常用水平, 设置各因素水平见表 1.

表 1 样品预处理条件因素正交试验水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal tests for optimization of sample preparation

水平	因素		
	Aa 热固定时间 /h	Ba 乙醇脱水时间 /min	Ca 4% 多聚甲醛固定时间 /min
1	1	1	10
2	2	3	15
3	3	5	30

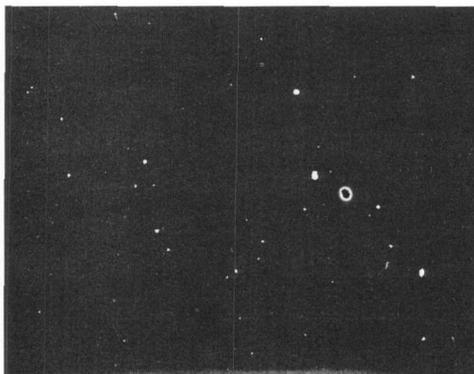
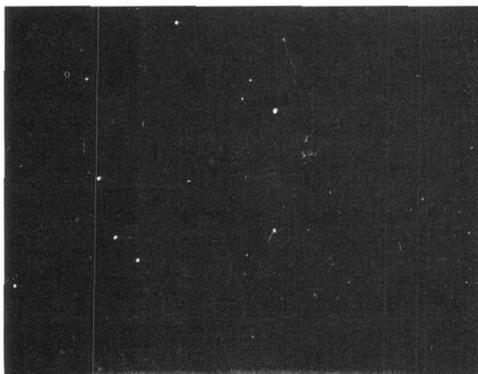


图 1 硅化玻片和明胶-钾明矾作黏附剂包被玻片的包被固定效果

Fig. 1 Fixed bacteria using silicified slide and gelatin-embedded slide respectively

2.4.2 杂交条件的优化 在原位杂交过程中, 杂交温度远低于 DNA 或 RNA 解链温度, 一般在 30~60°C 之间, 故需添加甲酰胺于杂交液中. 杂交时间过短会造成探针结合不完全, 杂交时间过长会增加非特异性着色. 因此, 杂交过程中的关键因素是杂交温度、杂交时间以及洗脱液的盐浓度. 故利用正交试验分别对这 3 个实验条件进行优化, 并选出最佳条件组合. 根据文献常用水平, 设置各因素水平见表 2.

表 2 杂交条件因素正交试验水平表

Table 2 Factors and levels of orthogonal test of hybrid optimization

水平	因素		
	Ab 杂交温度 /°C	Bb 杂交时间 /h	Cb NaCl 浓度 / (mmol L <sup>-1</sup> )
1	38	1	60
2	46	3	120
3	54	5	180

#### 2.5 定量检测亚硝酸盐氧化菌菌群的变化

在确定亚硝酸盐氧化菌检测条件的基础上, 对人工富集培养的 NOB 在不同生长时期的数量和相对丰度做连续时间的检测, 凸显了 FISH 技术比传统方法的优势. 每隔 12h 检测一次, 连续 196h 实验设 2 组平行.

### 3 结果 (Results)

#### 3.1 FISH 检测方法的建立

3.1.1 玻片处理方法的对比 使用硅化玻片和明胶包被玻片进行 FISH 实验的杂交照片如图 1 所示. 相比较可知, 对于同批等量的样品, 使用硅化处理的玻片进行 FISH 实验, 细胞丢失情况严重, 使用明胶-钾明矾 (质量比为 2:1) 作黏附剂包被的玻片进行 FISH 实验, 细胞丢失情况减少. 这是因为固定不牢的细胞样品容易在杂交和探针清洗过程中从玻片上洗脱掉, 不利于定性和定量分析.

3.1.2 样品预处理方法 分别将样品调至 pH 值为 5.5、6.5、7.5。结果显示, pH 为 6.5 的菌体分散效果明显好于其它 2 种情况。故在 pH 值为 6.5 的条件下, 检测不同稀释倍数在单个显微镜视野下的菌体分散情况, 使用 IPP 软件对照片荧光点计数, 结果如表 3 所示。由表可知, 稀释倍数过小, 单个视野内菌体数太多, 难以计数; 稀释倍数过大, 单个视野内菌体数太少, 不具备统计学意义。故选择在 pH 值

表 3 不同稀释倍数下单个视野中的菌体数

Table 3 The number of NOB observed under the fluorescence microscope

稀释倍数	荧光细胞数 / (cells mL <sup>-1</sup> )
10 <sup>2</sup>	太多, 无法计数
10 <sup>3</sup>	289 ± 21
10 <sup>4</sup>	30 ± 3
10 <sup>5</sup>	4 ± 1

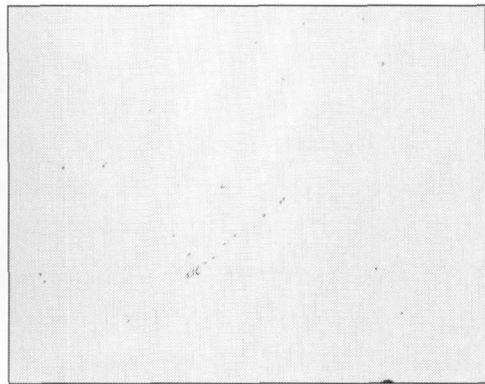
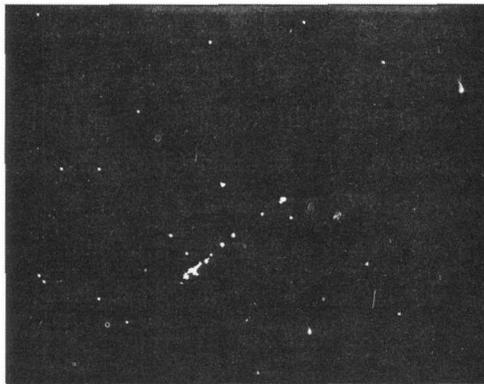


图 2 亚硝酸盐氧化菌的检测照片 (a 荧光照片, b 非荧光照片)

Fig. 2 Photographs of NOB (a fluorescence photo, b optical photo)

3.2 FISH 检测条件的优化

3.2.1 样品预处理条件的正交优化 对热固定时间 (Aa)、4% 多聚甲醛固定时间 (Ba) 和乙醇脱水时间 (Ca) 3 个因素做正交优化试验, 实验设置 2 个平行, 并设阴性和阳性对照, 使用正交助手 II 软件设计 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交表。统计单个视野内荧光点数后按细菌丰度公式 (1) 计算 E 值, 正交试验结果如表 4 所示, 结果的方差分析见表 5。

实验结果用极差分析法分析, 即计算第 i 因素第 k 水平所对应的 E 值, 并计算出 E 值的平均值, 由此判断 i 因素的优水平; 各因素的优水平即为最优组合, 计算极差 R<sub>i</sub>, 根据 R<sub>i</sub> 大小判断因素主次。结果可见: 对于热固定时间, k<sub>2</sub> > k<sub>3</sub> > k<sub>1</sub>, 即热固定 2h 较优。对于乙醇脱水时间, k<sub>3</sub> > k<sub>1</sub> > k<sub>2</sub>, 即乙醇脱水

为 6.5 的条件下, 稀释倍数为 10<sup>4</sup>, 检测纯培养的亚硝酸盐氧化菌。

分别使用单独热固定、单独多聚甲醛固定和先多聚甲醛固定后热固定 3 种方法进行比较, 结果显示, 先多聚甲醛固定后热固定的固定效果明显好于前 2 种方法。

3.1.3 FISH 检测方法的确立 采用上述较优实验方法检测亚硝酸盐氧化菌, 并做阳性和阴性对照。荧光照片即在激发光下, 已杂交细菌发射橙红色荧光时拍摄的照片。非荧光照片即无激发光在普通光照情况下拍摄的照片, 此时细菌没有发射荧光。荧光照片中的细菌即为 NOB, 非荧光照片中细菌为包括 NOB 在内的样品中所有细菌, 如图 2 所示。NOB 样品为纯培养样品, 由图对比可知, 菌体分散易计数, 杂交率可达 100%, 假阳性不明显, 故确定此套方法进行以下的 FISH 优化实验。

表 4 样品预处理条件优化-直观分析表

Table 4 Intuitive analysis for optimization of sample preparation

因素	Aa	Ba	Ca	E 值 / (cells mL <sup>-1</sup> )
实验 1	1	1	1	41
实验 2	1	2	2	40
实验 3	1	3	3	36
实验 4	2	1	3	54
实验 5	2	2	1	65
实验 6	2	3	2	85
实验 7	3	1	2	49
实验 8	3	2	3	40
实验 9	3	3	1	73
k <sub>1</sub>	40.000	49.667	62.000	
k <sub>2</sub>	73.667	48.333	63.000	
k <sub>3</sub>	55.333	71.000	44.000	
R	33.667	22.667	19.000	

表 5 样品预处理条件优化的方差分析表

Table 5 Variance analysis of orthogonal experiments for optimization of sample preparation

因素	平方和 $S$	自由度 $f$	均方 MS	$F$ 值	$p$ 值
Aa	1262	2	631	20.8022	0.0459
Ba	544.6667	2	272.3333	8.978	0.1002
Ca	484.6667	2	242.3333	7.989	0.1113
误差	60.6667	2	30.3333		
总和	2352	8			

5m in 较优. 对于 4% 多聚甲醛固定时间,  $k_2 > k_1 > k_3$ , 即 4% 多聚甲醛固定 15m in 较优. 综合 3 个较优条件, 样品预处理条件的优化后组合为: 热固定 2h, 乙醇脱水 5m in, 4% 多聚甲醛固定 15m in. 比较 3 个因素极差,  $R_1 > R_2 > R_3$ , 可知 3 个因素中热固定时间对杂交结果的影响最大, 其次是乙醇脱水时间, 4% 多聚甲醛固定时间对其影响最小. 方差分析表中, 热固定时间 (Aa) 的  $p$  值小于 0.05, 可见此因素对结果有显著性影响, 而乙醇脱水时间 (Ba) 和 4% 多聚甲醛固定时间 (Ca) 的  $p$  值均大于 0.05, 说明这 2 个因素对结果的影响不大.

3.2.2 杂交条件的正交优化 在样品预处理的最佳条件下, 对杂交温度、杂交时间以及洗脱液中盐浓度 3 个因素, 参考文献记载的常用水平, 进行正交试验. 阴性对照和阳性对照显示, 杂交条件的改变会产生假阳性增多、杂交特异性下降等问题, 故不能以每个视野中的荧光点数量平均值来评定. 鉴于用于实验的亚硝酸盐氧化菌是经分离纯化培养得到的, 且其纯度很高, 故以荧光细胞数为基准. 有激发光时单个视野内荧光细胞数为  $Y$ , 无激发光时单个视野内的细胞数为  $K$ , 则实验结果以  $Y \cdot K^{-1}$  的平均值来评定.  $Y \cdot K^{-1}$  的平均值越接近 1, 则在对应的杂交条件下, 杂交特异性越好, 杂交严格度越高, 检测结果越可信、越清晰. 使用正交助手 II 软件设计  $L_9(3^4)$  正交表, 结果如表 6 所示, 结果的方差分析见表 7.

实验结果用极差分析法分析, 即计算第  $i$  因素第  $k$  水平所对应的  $E$  值, 并计算出  $E$  值的平均值, 由此判断  $i$  因素的最优水平, 各因素的最优水平即为最优组合; 计算极差  $R_i$ . 根据  $R_i$  大小判断因素主次. 结果可见: 对于杂交温度,  $k_2 < k_3 < k_1$ , 即在 46°C 下杂交效果较好. 对于杂交时间,  $k_2 < k_1 < k_3$ , 即杂交 5m in 效果较好. 对于洗脱液中 NaCl 浓度,  $k_1 < k_2 < k_3$ , 即洗脱液中 NaCl 浓度 60mmol  $L^{-1}$  时效果较好. 综合 3 个因素, 杂交条件的优化组合为杂交温度

表 6 杂交条件优化-直观分析表

Table 6 Intuitive analysis for hybrid optimization

因素	Ab	Bb	Cb	$Y \cdot K^{-1}$
实验 1	1	1	1	13.5
实验 2	1	2	2	15.0
实验 3	1	3	3	23.8
实验 4	2	1	2	2.8
实验 5	2	2	3	1.4
实验 6	2	3	1	3.0
实验 7	3	1	3	5.5
实验 8	3	2	1	0.8
实验 9	3	3	2	4.0
$k_1$	24.100	7.267	5.767	
$k_2$	2.400	5.733	7.267	
$k_3$	3.433	16.933	16.900	
$R$	21.700	11.200	11.133	

表 7 杂交条件优化的方差分析表

Table 7 Variance analysis of orthogonal experiments of hybrid optimization

因素	平方和 $S$	自由度 $f$	均方 MS	$F$ 值	$p$ 值
Aa	423.0689	2	211.5344	35.0545	0.0277
Ba	31.9022	2	15.9511	2.6433	0.2745
Ca	31.0022	2	15.5011	2.5688	0.2802
误差	12.0689	2	6.0344		
总和	498.0422	8			

46°C、杂交时间 3h、洗脱液中 NaCl 浓度 60mmol  $L^{-1}$ . 比较 3 个因素极差,  $R_1 > R_2 > R_3$ , 可知 3 个因素中杂交温度对杂交结果的影响最大, 其次是杂交时间, 洗脱液中 NaCl 浓度对其影响最小. 方差分析表中, 杂交温度 (Ab) 的  $p$  值小于 0.05, 可见此因素对结果有显著性影响, 而杂交时间 (Bb) 和洗脱液中 NaCl 浓度 (Cb) 的  $p$  值均大于 0.05, 说明这 2 个因素对结果的影响不大.

3.2.3 定量检测亚硝酸盐氧化菌群变化 在上述最佳预处理和最佳杂交条件下, 连续 7d 取样定量检测纯培养中的亚硝酸盐氧化菌, 每个样品设 2 组平行, 用 Image-Pro Plus 软件对所摄照片处理分析计数, 得到结果见图 3.

由图 3 可知, 人工纯培养的亚硝酸盐氧化菌菌群在时间上的分布, 菌体数量在 0~12h 内增幅很小, 说明菌群处于延迟期; 12~60h 菌体数量猛增, 说明菌群处于对数生长期; 60~120h 菌体数量基本维持在  $6.0 \times 10^9$  个左右, 说明菌群维持在稳定期; 120h 以后菌体数量明显下降, 菌群进入衰亡期. 此结论也证实了亚硝酸盐氧化菌生长非常缓慢, 生长

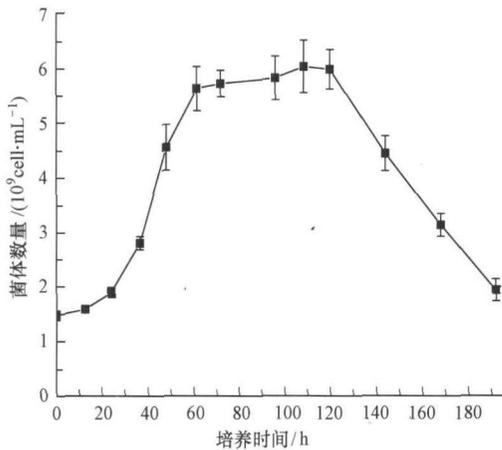


图3 亚硝酸盐氧化菌菌群丰度随时间推移的数量变化

Fig. 3 Quantity curve of the nitrite-oxidizing bacteria community

周期长的特征。

#### 4 讨论 (Discussion)

本研究中针对硝化细菌中的亚硝酸盐氧化菌构建了一套荧光原位杂交定量检测方法,并对影响杂交效果的各项指标针对性地进行了优化。结果证明,使用明胶包被玻片能提高样品的固定效果,调节样品的 pH 值至 6.5 可以明显缓解 NOB 的成团状态,样品采用  $10^{-4}$  稀释率使单个视野内的菌体量介于 20~40 之间,便于计数。采用 4% PFA 固定后再热固定的样品固定方法还未见报道,结果证实 3 种固定方法中此方法得到的杂交效果最佳。

样品预处理的条件对样品的固定效果和杂交率有较大影响,其中热固定时间 2h 最佳,也与文献中常用的热固定时间正好吻合(张明, 2003)。杂交条件对 FISH 定量准确度起着至关重要的作用,正交试验结果说明:杂交的时间、温度对探针的特异性有很大影响,在 46°C 下杂交效果最好,也与文献中常用的杂交温度符合(Wagner *et al.*, 1995; 于仁成等, 2006; 曾薇等, 2006)。这是由于原位杂交中 DNA 的解链是在去离子甲酰胺(DAF)的作用下进行的,因而解链温度远低于常见解链温度。

传统定量检测亚硝酸盐氧化菌的方法主要有 MPN 法计数和底物降解率表示法。MPN 法作为一种传统的检测方法不仅耗时长,至少需 4~8 周,而且难以检测不可培养或不活跃的细胞,导致结果偏低。底物降解率可以表示 NOB 的生长状况,但底物消耗旺盛可能是菌体活跃和菌体数量增多 2 方面原因导致的,因此,这种方法无法确定菌体的数量变化情况,相比之下, FISH 检测方法不仅大大的节省

了时间和工作量,检测特异性更强,结果也更加准确。本研究中建立的针对亚硝酸盐氧化菌 FISH 检测方法,可以直观地检测出 NOB 在空间时间上的数量分布。因此,在对 NOB 的鉴定和计数等方面进行研究时,除了传统的培养和 MPN 等方法外,选用分子生物技术手段——FISH 技术不失为一种更好的选择。不过 FISH 方法的检测可能还包括了少数死亡的细胞,因而较用培养方法的结果高一些,这方面还需进一步研究改进。

FISH 技术也为研究环境中微生物菌群的活动提供了有力的技术支持。本研究中仅对纯培养中的亚硝酸盐氧化菌菌群在不同时间上的丰度变化进行了检测,在 7d 内测定出了精确的菌群丰度变化曲线,同样的方法也可应用于环境中的 NOB。环境微生物中存在很多生长周期长、变异种类多、不可人工培养的情况, FISH 技术快速、简便、准确的优点将会对环境微生物的研究中有广阔的前景。

#### 5 结论 (Conclusions)

确定了 FISH 技术检测亚硝酸盐氧化菌的具体方法:采用明胶包被玻片,多聚甲醛加热固定的方法,提高了样品固定效果;调节样品 pH 值至 6.5 可以明显缓解亚硝酸盐氧化菌的成团现象;单个视野内的菌体量介于 20~40 个之间时最宜于计数。

优化了定量分析亚硝酸盐氧化菌样品预处理和杂交过程的实验条件,正交试验得到的最佳亚硝酸盐氧化菌 FISH 检测的条件为:样品预处理时热固定 2h, 4% 多聚甲醛固定 15min, 乙醇脱水 5min, 杂交时杂交温度 46°C, 杂交时间 3h, 洗脱液中 NaCl 浓度  $60\text{mmol L}^{-1}$ 。

责任作者简介:林炜铁,博士,主要从事发酵工程、环境微生物和食品生物技术等方面的研究工作,曾主持国家自然科学基金、国家重点科技攻关和广东省自然科学基金等多项国家、省部科研项目和企业合作项目。

#### 参考文献 (References):

- Amann R, Krumholz L, Stahl D A, *et al.* 1990. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology [ J ]. *J Bacteriol* 172 ( 15 ): 762—770
- Amann R, Fuchs B M, Behrens S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization [ J ]. *Curr Opin Biotechnol* 12: 231—236
- Rittman B E, McCarty P L. 1999. *Environmental biotechnology*.

- Principles and applications [ J ]. McGraw-Hill New York, 340—346
- Mohary B K, Wagner M Urbain V, *et al*. 1996 Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria [ J ]. Appl Environ Microb, 62: 2156—2162
- Domingues M R, Araujo J C, Varesche M B *et al*. 2002 Evaluation of thermophilic anaerobic microbial consortia using fluorescence in situ hybridization (FISH) [ J ]. Water Sci Technol, 45(10): 2733
- Lorenzen J, Larsen L H, Kjer T, *et al*. 1998 Biosensor determination of the microscale distribution of nitrate nitrate assimilation, nitrification and denitrification in a diatom-inhabited freshwater sediment [ J ]. Appl Environ Microbiol, 64(9): 3264—3269
- 李艳娜, 许科伟, 堵国成, 等. 2007. 厌氧生境体系中产氢产乙酸细菌的 FISH 定量解析 [ J ]. 微生物学报, 47(6): 1038—1043
- Li Y N, Xu K W, Du G C, *et al*. 2007. Quantitative use of fluorescence in situ hybridization to detect syntrophic acetogenic bacteria in anaerobic environmental samples [ J ]. Acta Microbiologica Sinica, 47(6): 1038—1043 ( in Chinese)
- Sato H, Okabe S, Yanaguchi Y, *et al*. 2003. Evaluation of the impact of bioaugmentation by in situ hybridization and microelectrode [ J ]. Water Research, 37(9): 2206—2216
- Wagner M, Rath G, Amann R, *et al*. 1995. In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria [ J ]. Syst Appl Microbiol, 1: 251—264
- Wagner M, Noguera D. 1998 Combining fluorescent in situ hybridization with cultivation and mathematical modeling to study population structure and function of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge [ J ]. Water Sci Technol, 37: 441—449
- 于仁成, 唐祥海, 张清春, 等. 2006 应用荧光原位杂交方法检测中国沿海塔玛/链状亚历山大藻复合种(亚洲温带基因型) [ J ]. 环境科学学报, 26(4): 646—651
- Yu R C, Tang X H, Zhang Q C, *et al*. 2006 Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) method to detect “*tamarensis/atnellia* species complex” in Genus *Alexandrium* along Chinese coast [ J ]. Acta Scientiae Circumstantiae, 26(4): 646—651 ( in Chinese)
- 张明. 2005. 硝化细菌应用技术研究 [ D ]. 上海: 华东师范大学, 46—51
- Zhang M. 2005. Research on the Application Technology of Nitrifying Bacteria [ D ]. Shanghai East China Normal University, 46—51 ( in Chinese)
- 曾薇, 杨庆, 张树军, 等. 2006 采用 FISH、DGGE 和 Cloning 对短程脱氮系统中硝化菌群的比较分析 [ J ]. 环境科学学报, 26(5): 734—739
- Zeng W, Yang Q, Zhang S J *et al*. 2006 Analysis of nitrifying bacteria in shortcut nitrification-denitrification processes by using FISH, PCR-DGGE and Cloning [ J ]. Acta Scientiae Circumstantiae, 26(5): 734—739 ( in Chinese)