

DAPI 荧光染色计数法的感潮河段沉积物细菌数量测量影响因素研究

陈琛, 黄珊, 吴群河*, 李锐仪, 张仁铎

(中山大学环境科学与工程学院, 广州 510275)

摘要:采集珠江广州河段沉积物样品, 分析沉积物质地与有机质含量, 同时分析了改良 DAPI 染色操作方法并讨论各因素对 DAPI 染色剂染色效果的影响, 研究 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylidole) 荧光染色剂在具有感潮性质的沉积物样品中的染色影响因素。结果表明, 沉积物稀释 2 000 倍, 超声浴 10 min, DAPI 浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 染色时间 30 min 以上时, 可以得到最佳细菌计数数量。细菌数量与褪色比例有良好的相关性($r = 0.587$, $p = 0.004$)。粒径组成与有机质含量有较强的相关性, 它是通过影响有机质含量来影响褪色比例的, 因此有机质也与褪色比例有一定的相关性。将褪色比例与有机质含量、细菌数量及黏粒比例做回归分析, 得到与实测值相关性较好($r = 0.694$)的拟合值。这些结果表明, 在使用 DAPI 荧光染色法研究感潮河段沉积物细菌数量的过程中, 应充分考虑上述影响因素。

关键词:DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylidole) 荧光染色计数法; 细菌数量; 沉积物; 感潮河段; 染色影响因素

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)08-1918-08

Factors Affecting the DAPI Fluorescence Direct Count in the Tidal River Sediment

CHEN Chen, HUANG Shan, WU Qun-he, LI Rui-yi, ZHANG Ren-duo

(School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The factors affecting the DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylidole) fluorescence direct count in the tidal river sediment were examined. Sediment samples were collected from the Guangzhou section of the Pearl River. Besides sediment texture and organic matter, an improved staining procedure and the involved parameters were analyzed. Results showed that the procedure with the sediment with 2 000 fold dilution and ultrasonic water bath for 10 min, and with a final DAPI concentration of $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and staining time for more than 30 min produced the optimum results of DAPI direct count in the sediment. The total bacterial number was correlated to the proportion of the non-nucleoid-containing cells to the total bacterial number($r = 0.587$, $p = 0.004$). The organic matter content also correlated to the ration. The clay content had a strong correlation with the organic matter, through which the clay content also affected the ratio. A multiple regression analysis between the ration versus the organic matter, the total bacterial number, and the clay content showed that the regression equation fit the measure values satisfactorily($r = 0.694$). These results indicated that the above factors needed to be considered in the applications of the DAPI fluorescence direct counting method to the tidal river sediment.

Key words: DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylidole) fluorescence direct count; bacteria abundance; sediment; tidal river; staining factors

准确测定沉积物中细菌的数量是认识沉积物中细菌活性及其对污染物质转化作用的重要步骤。直接计数法计算细菌数量(direct count), 即通过显微镜直接观察计数, 由于不需要培养, 一般能比间接计数法如平板计数法(plate count)计算的细菌数量高 1~3 个数量级^[1]。基于此, 直接计数法逐渐代替传统的间接计数法, 成为一种新的通用的细菌总数计数法。吖啶橙 [3, 6-bis(dimethylamino) acridinium chloride] 和 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylidole) 是 2 种常用于直接计数法的荧光染料。相对于吖啶橙计数法不易区分出细菌和黏土、胶体、碎石等非生命的颗粒物, 具有更好特异性的 DAPI 能与细菌 DNA

结合时发蓝光, 结合到无 DNA 的物质时发出淡黄光, 因此 DAPI 荧光染色计数法更适合于沉积物环境的计数^[2]。然而, 环境中仍有一些非生命物质能被 DAPI 染色剂所染色而造成细菌计数的误差。沉积物的复杂环境加剧这类非特异性染色所造成的细菌计数误差^[3, 4]。首先是沉积物的质地不均一影响计数效果, 细菌容易附着在沉积物中而不易分散, 因此需要通过稀释、超声实验将沉积物均质化, 并将细

收稿日期: 2009-10-16; 修订日期: 2009-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(50779080)

作者简介: 陈琛(1986~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为沉积物生态群落与营养盐循环, E-mail: es04cc@mail2.sysu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: eeswqh@mail.sysu.edu.cn

菌从沉积物中分离。其次,DAPI 操作步骤影响染色效果,包括 DAPI 染色剂的浓度和染色时间。染色不充分会低估细菌的数量,而过量的染色将使背景色过高而造成计数不便^[5]。第三是细菌和杂质的含量也会影响计数效果,一些形态大小与细菌相似的无机质和有机质会影响 DAPI 正确染色效果^[6,7],而 Zweifel 等^[1]在传统的 DAPI 染色步骤的基础上加了异丙醇褪色步骤,把加入褪色步骤计算出的细菌数量(nucleoid-containing cells, NUCCs)视为有明显代谢活性的细菌数量,在沉积物环境中由于异丙醇还能将与细菌相似的杂质染色去除掉,因此也可以看做是对 DAPI 荧光染色计数法的改进。

在进一步研究各因素之间的相关性时,Karner 等^[8]发现浮游细菌中细菌总数与 NUCCs 数量并非总是线性相关;Fischer 等^[9]和 Luna 等^[10]分别指出细菌总数和 NUCCs 数都与有机质含量有关,但影响机制不明确;Polymenakou 等^[11]则显示只有可溶性有机质与细菌数量有关。然而,影响细菌数量及 DAPI 染色效果的因素是多方面的,单纯的研究某一影响因素不够全面,因为会忽略它们之间的共同作用。

具有感潮性质的河段是河流和海洋的过渡地带,由于潮汐的涨落使物质的传输不仅存在着水平运动,也存在着垂直混合运动,因此它对物质的分布具有重要影响^[12],其理化环境的复杂性也使其具有比普通河流及海洋更复杂的生物环境^[13]。本实验以具有感潮特性的珠江广州河段为研究对象,该河段长期受工业和生活的双重污染,因此它兼有河口和城市河流的特点。本研究将分析这一河段中有机质、粒径组成等对 DAPI 染色计数法染色效果的影响,以期为进一步测定分析珠江广州河段沉积物中细菌种类和活性的垂向分布提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集和前处理

2008 年 4 月 10 日,于珠江广州河段的 3 个位置各采集 1 个沉积柱样品,分别为珠江大桥(113°13'16"E, 23°7'36"N;沉积柱 I)、花地涌(113°13'22"E, 23°6'8"N;沉积柱 II)和二沙岛(113°17'2"E, 23°6'50"N;沉积柱 III)。珠江大桥处沉积物的砂质含量高,而有机质含量低;花地涌处沉积物受生活污染严重,曾被挖掘清淤,泥黑且有分层现象,有机质及营养元素含量高;二沙岛处沉积物的黏粒含量高,表层含杂质较多,受人为扰动少,在整个

剖面上性质较均一^[14]。采样过程为无菌操作,采用自制真空芯型采样器,采样管管长 50 cm,管内径为 8 cm。采样后立即密封沉积柱,并置于冰箱内低温(4℃)暗存,运回实验室进行下一步分析。

1.2 样品切割和前期处理

移去沉积柱的上覆水,对内核切割分层,依据珠江每年平均沉积速率取 12 mm 为一层,取其中 7 层,从表层向下,7 层的顺序分别为:0~12 mm、24~36 mm、60~72 mm、96~108 mm、144~156 mm、204~216 mm、300~312 mm。每层取 1 g 左右的沉积物。另取河段表层沉积物样品用于参数调整实验,对每项参数调整实验取 3 个重复样。在每个沉积物样本中,加入 10 mL 用 0.2 μm 聚碳酸酯膜(Whatman)过滤后的甲醛(浓度为 20%)以固定样品,低温(4℃)暗存至使用。将以上剩余样本装入聚乙烯袋中,用于测定各层的 pH、TN、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、有机质、粒径分布及含水率^[15]。

1.3 DAPI 染色计数法测定细菌数量

修改 Zweifel 等^[1]和 Schallenberg 等^[16]的方法,调整 DAPI 染色计数法各项参数,测定沉积物中的细菌数量,将第一次细菌计数数量对应细菌总数量,将第二次细菌计数数量对应 NUCCs 数量。简要步骤如下。

(1)沉积物均质化 取经过预处理并低温(4℃)暗存样品,以无菌水进行稀释处理:包括 1 000 倍、2 000 倍及 3 000 倍 3 种稀释处理,加入少量曲拉通(最终浓度 0.1%)。将每种稀释处理样品用 280 W 超声仪(AS10200BDT)分别进行 5、10、15 min 的超声浴(共 9 种处理,见表 1)。每种处理进行 3 个重复。

(2)DAPI 染色 对于第 1 步中取得最佳均质化条件的样本,取 1 mL 子样品,加入少量 DAPI 使染色剂最终浓度分别为 5、10 及 15 μg·mL⁻¹ 3 种处理。室温下暗室染色 30 min。每种处理进行 3 个重复。

(3)制片及第一次计数 将染色后样品过滤至 0.2 μm 的黑色聚碳酸酯膜(Whatman)上,并用少量无菌水洗涤。滤膜在载玻片上干燥 5 min,在荧光显微镜紫外光下计数(视野放大 400 倍)。随机选择 20 个视野以上,只计算清晰可见且为蓝光的细胞。

(4)褪色及第二次计数 取 DAPI 染色并第一次计数后的膜,加入 1 mL 60~70℃ 异丙醇洗涤(1 min)。滤膜在载玻片上风干 5 min,在荧光显微镜紫外光下计数(视野放大 400 倍)。随机选择 20 个视

表 1 各沉积柱理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of the sediment layers

沉积柱	理化性质	分层/mm						
		0 ~ 12	24 ~ 36	60 ~ 72	96 ~ 108	144 ~ 156	202 ~ 216	300 ~ 312
I	含水率/%	35.97	24.79	57.78	52.13	28.32	34.02	
	有机质含量/%	2.61	6.24	10.5	9.18	4.72	3.49	
	黏粒比例/%	11.23	8.89	7.36	7.65	6.87	10.97	
II	含水率/%	64.50	37.94	61.08	37.12	49.67	62.71	62.67
	有机质含量/%	6.80	6.87	7.33	7.08	8.44	9.23	8.59
	黏粒比例/%	7.74	8.59	9.75	8.65	7.53	8.01	7.77
III	含水率/%	40.54	48.16	51.81	51.32	48.47	47.75	43.15
	有机质含量/%	3.11	4.44	5.53	6.38	5.41	4.93	4.12
	黏粒比例/%	10.90	10.93	11.18	9.80	10.09	11.17	10.85

野以上,只计算清晰可见且为蓝光的细胞。

为了表征影响 DAPI 荧光染色的相关因素,本研究定义褪色比例(%)为:

$$Y = \frac{N_d}{N_t} \times 100\% \quad (1)$$

式中, N_t 为第一次细菌计数数量(即褪色前细菌数量), N_d 为褪色消失的那部分“细菌”数量(即第一次计数数量与第二次计数数量之差)。

为了同以上方法进行比较,本实验另外以牛肉膏蛋白胨为培养基,用平板计数法平行测定沉积物中可培养细菌的数量。

1.4 数据分析

使用 One-way 显著性差别分析(ANOVA)来辨别细菌数量和营养物质随采样地点及深度变化的差异。相关系数分析建立在 $p < 0.05$ 概率水平的基础上。所有数据用 Excel 和 SPSS V13.0 软件计算分析。

2 结果与讨论

2.1 沉积物理化性质与细菌计数

沉积物质地的不均一性影响 DAPI 荧光染色计数法的染色效果,本实验中沉积物的理化性质见表 1。为了达到计数的准确和统一,需要针对不同的沉积物调整样品处理方法。对样品进行稀释和超声处理有助于沉积物细菌的分散。沉积物稀释倍数太低,则细菌容易被颗粒物所掩蔽,造成细菌数量被低估;而稀释倍数太高,则细菌过于分散,显微镜每个视野内偏差较大,造成计数不够稳定^[16]。超声能使沉积物均质化,从而将细菌由附着的沉积物相中分离,但是过度的超声会使细胞膜破裂而减少细菌数量^[5]。本研究在调试超声分散时间的过程中出现细菌数量先上升后下降的现象(表 2),最终选择细菌计数达最多时的条件作为推荐的实验操作方法,即稀释 2 000 倍并超声

表 2 各均质化条件下表层沉积物细菌数量

(以干重记) $\times 10^8 / \text{cells} \cdot \text{g}^{-1}$

Table 2 Different protocols for DAPI direct cell counting (dry weight) $\times 10^8 / \text{cells} \cdot \text{g}^{-1}$

稀释倍数	超声时间/min		
	5	10	15
1 000	2.13 $\pm$ 1.40 ¹⁾ aA ²⁾	2.29 $\pm$ 1.57 aA	1.63 $\pm$ 1.12 bA
2 000	2.11 $\pm$ 1.50 aA	3.58 $\pm$ 2.60 bB	2.99 $\pm$ 1.89 bB
3 000	1.27 $\pm$ 0.74 aB	1.36 $\pm$ 0.62 aC	1.26 $\pm$ 0.73 aC

1) 数值为均值 $\pm$ 标准差 ($n = 3$); 2) 不同小写字母表示横向显著性差异,不同大写字母表示纵向显著性差异 ($p < 0.05$)

10 min,这也符合前人研究的一般规律^[5,16]。

2.2 DAPI 染色与细菌计数

DAPI 染色实验包括 DAPI 浓度及染色时间。在 DAPI 浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细菌显色不清晰,细菌数量偏少;DAPI 浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细菌与背景色能较好分辨;DAPI 浓度为 $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,大量杂质被染色,造成细菌计数困难。染色时间对 DAPI 计数法效果影响不大,染色 30 min 以上足以达到要求。

DAPI 染色剂的浓度决定染色细菌的清晰程度及杂质被染色的程度。尽管 Schallenberg 等^[16]指出 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DAPI 浓度能适应含水率含量为 64% ~ 99% 的沉积物的细菌染色,但由于沉积物质地和细菌数量的不同,因此最佳 DAPI 浓度也有所改变。本实验中细菌计数效果最佳时 DAPI 浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,这与 Haglund 等^[6]选择的 DAPI 计数浓度相同。而 DAPI 染色时间由于对染色效果影响不大,选择比较通用的 30 min^[6]。

2.3 细菌数量垂向分布

用改进的 DAPI 荧光染色计数法测定珠江广州河段细菌数量,褪色前 3 个沉积柱采样点表层(0 ~ 12 mm)第一次计数数量(以干重记,下同)平均为 $8.09 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{g}^{-1}$,至底层(300 mm 以下)下降至

$3.42 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{g}^{-1}$ (图 1), 即 300 mm 以下细菌数量仍然有表层细菌数量的一半以上. 加入褪色步骤后细菌数量减少 12% ~ 57%, 即第二次计数细菌数量占第一次计数数量的 43% ~ 88%. 与第一次计数数量的垂向规律相似, 第二次计数细菌数量随沉积物深度而下降, 在表层 (0 ~ 12 mm) 达到最高值 $4.44 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{g}^{-1}$, 至最深处 (300 mm 以下) 下降至 $2.82 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{g}^{-1}$.

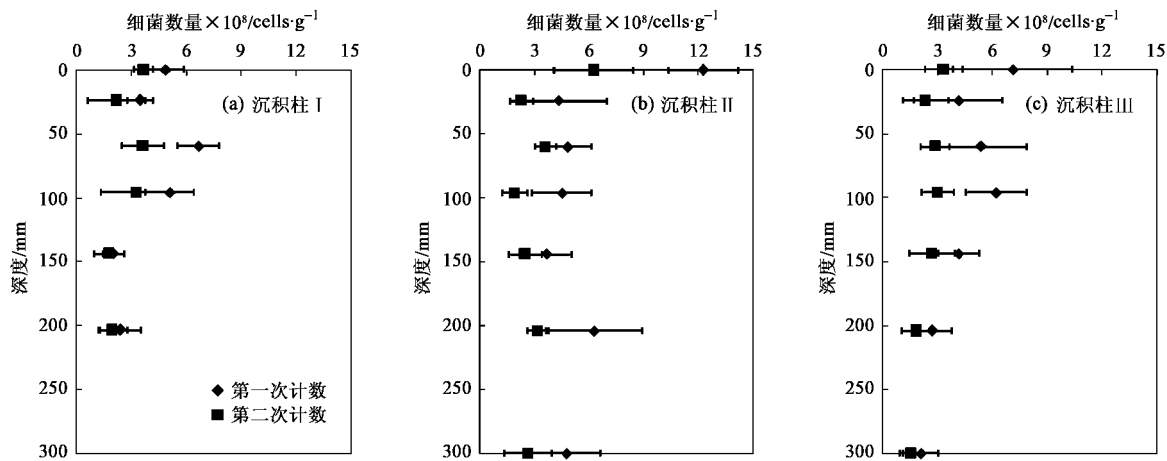


图 1 沉积物褪色处理前后细菌数量随深度变化
Fig. 1 Total bacterial counts before and after the destaining treatment vs. the depth

而在 DAPI 计数与平板计数法的对比实验中 2 种计数法所得到的计数结果相似 ($r = 0.748$), 但 DAPI 计数法所得到的细菌数量比平板计数法多 1 ~ 2 个数量级 (见表 3). 可培养细菌比例 (即平板计数数量 / DAPI 计数数量) 先呈上升趋势, 在 144 ~ 156 mm 区间内达到最大值 5.66%, 而在 200 mm 处降至 3.51%, 表层以下可培养细菌比例与有机质含量呈现出反比例关系.

表 3 DAPI 计数细菌数量与平板计数法数量对比 (以干重计)

项目	plate count (dry weight)				
	沉积物深度 / mm				
	0 ~ 12	24 ~ 36	96 ~ 108	144 ~ 156	202 ~ 216
DAPI 第二次细菌计数数量 $\times 10^7 / \text{cell} \cdot \text{g}^{-1}$	4.67	1.87	1.54	1.94	2.55
平板计数法 $\times 10^5 / \text{cells} \cdot \text{g}^{-1}$	11.93	7.46	6.86	1.10	8.96
有机质含量 / %	6.37	7.46	7.07	3.97	4.70

细菌数量随深度下降的现象具有普遍性^[4, 6, 9], 这是因为在表层接近上覆水的地方, 细菌能得到较多的营养元素、氧气以及适宜的温度; 随着深度加大, 细菌生长的限制因子增多, 细菌数量下降很快. 然而本实验中, 300 mm 以下细菌数量仍然约为表层细菌数量的 1/2, 即这部分细菌在地球生物化学循

环中仍然具有重要意义. 由于采样地沉积物的均一性不同, 文献报道中第二次计数细菌数量占第一次计数细菌数量的比例也不相同. 如 Haglund 等^[6]报道的比例为 13% ~ 52%, Polymenakou 等^[11]研究中其比例则为 18% ~ 97%. 本研究的比例 (47% ~ 76%) 在文献报道的范围内. 细菌数量和杂质的减少也直接反映在显微镜下, 在褪色前背景中有较多黄绿色的非生物物质, 而褪色后这类物质明显减少, 细胞的形态也更清晰. 这充分说明了如果采用传统的 DAPI 染色法, 将会高估沉积物中细菌的数量而低估细菌的活性比例.

以培养为手段的平板计数法作为常用的一种细菌计数方法, 在测定环境中可培养性异样细菌方面仍占有重要地位^[17, 18]. 本实验中 DAPI 计数数量与平板计数法数量有较好相关性, 这显示了 DAPI 计数的准确性; 而直接计数法能比平板计数法多出 1 ~ 3 个数量级在文献报道中也比较常见^[1, 19], 证明 DAPI 计数优于平板计数法. 本实验中可培养细菌比例与有机质含量变化趋势相反 (见表 3). 有机质对细菌的种类和数量有重要的影响, 但是环境中大部分的细菌是较难进行培养的 (如反硝化细菌及厌氧氨氧化细菌)^[20, 21], 因此有机物含量越高, 不可培养细菌的比例就越大, 这种变化趋势随着深度的改变会更加明显.

2.4 褪色效果的影响因素

异丙醇的用量在一定程度上会影响褪色效果,但褪色比例的多少主要是由沉积物的性质决定,因此本研究分析了褪色效果的影响因素,建立了褪色比例与一些沉积物性质及褪色前细菌总数的关系(表4)。

表4 染色效果影响因子相关系数(r)矩阵¹⁾

Table 4 Correlation coefficient (r) matrix between the factors affecting the destaining effect

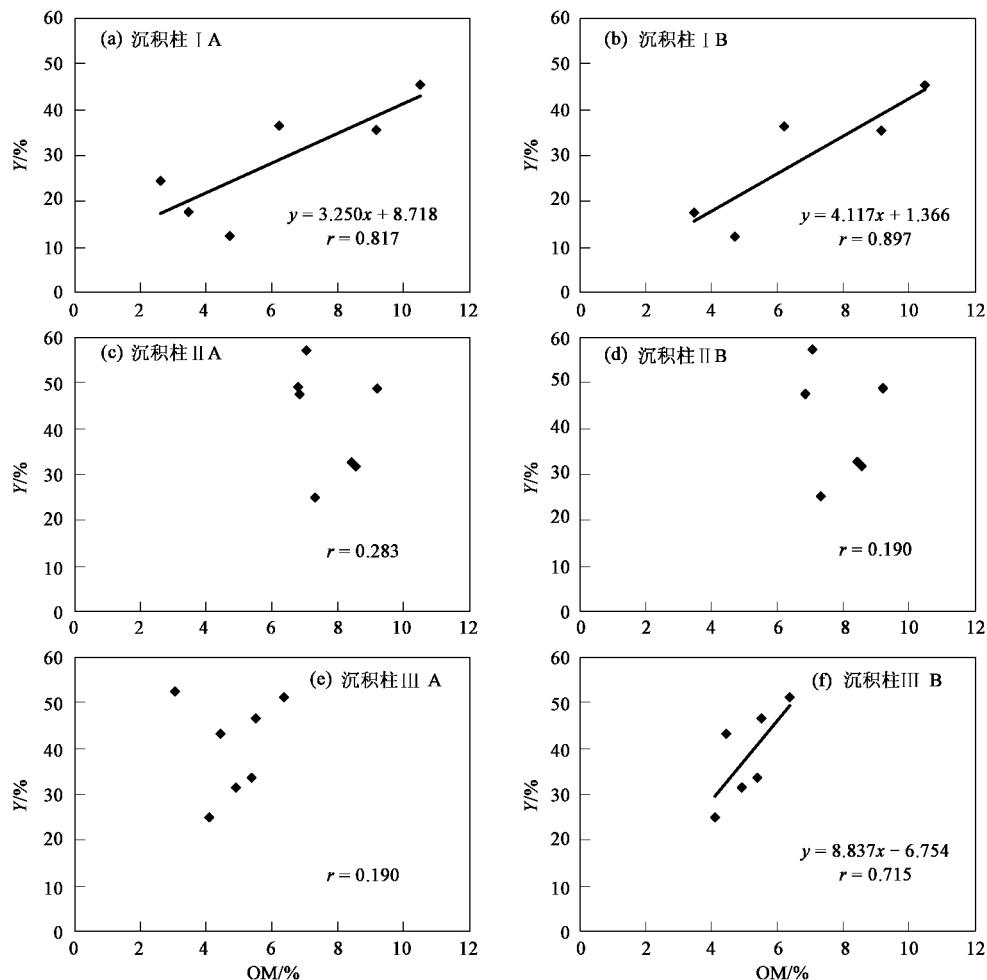
	Y	OM	TB	Clay
Y	1.000	0.321	0.614 **	0.071
OM		1.000	0.286	0.764 **
TB			1.000	0.237
Clay				1.000

1) Y: 褪色比例; OM: 有机质含量; TB: 第一次细菌计数数量; Clay: 黏粒含量; * * 表示显著性差异水平为 $p < 0.01$

2.4.1 褪色比例与有机质含量的相关性

采样点各深度有机质含量与褪色比例之间存在着一定的相关性。在沉积柱 I 处相关性尤为明显($r = 0.817$, $p < 0.05$), 去掉表层(0~12 mm)数据后相关性提高($r = 0.879$)。对于沉积柱 III, 有机质含量与褪色比例并无相关性($r = 0.071$), 但在去掉表层后, 有机质含量和褪色比例有较强的相关性($r = 0.715$)。而沉积柱 II 在去表层前后褪色比例与有机质含量之间的关系不显著(图2)。

本实验中, 去除表层样本的数据后, 褪色效果与有机质含量间的相关性变强, 是因为沉积物表层易受水动力学的干扰, 营养物质在沉积物-水界面上下输送且流动频繁, 因此相对于较深层沉积物而言, 表层沉积物的理化、生物性质较不稳定^[22, 23]。珠江广州河段的河流和潮流都比较强, 它们之间的互相作用加剧了沉积物表层理化性质的不稳定性。另一个



A 为去表层前, B 为去表层后; Y: 褪色比例; OM: 有机质

图2 各沉积柱去表层(0~12 mm)前后褪色比例与有机质含量关系

Fig. 2 Relationships between Y and the organic matter with and without the surface layer

原因是此河段属于城市河流,表层含有较多的非生物物质、原生动物等杂质(沉积柱Ⅲ尤为明显),这些物质容易被 DAPI 误染色,从而出现有机质含量不高但褪色比例偏高的现象.因此只有在表层以下,环境比较稳定且易被误染色物质分布均匀时,褪色比例与有机质含量间才有较好的相关关系.

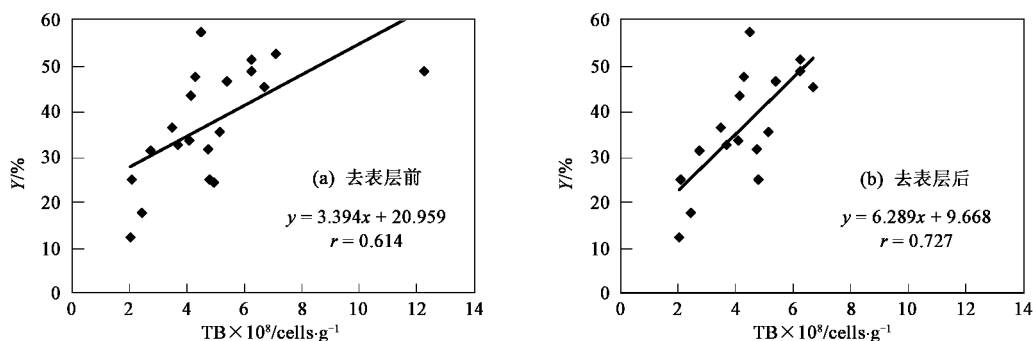
沉积柱Ⅱ中两者相关性最低,主要由于采样地点曾进行人为沉积物疏浚,这不仅导致含水率、有机质含量、三氮在垂向上分层现象严重,也可能是造成有机质形态和含量、细菌数量变动的原因.同时也说明了沉积物受到地形、水动力和物质等各方面影响,异质性很高^[16].

有机质是影响褪色比例的一个因素^[6],有机质的存在一方面会影响细菌的分散,降低染色效果,另一方面,有机质本身也会被 DAPI 错误染色而干扰显微镜下直接计数.尽管在某些采样点中有机质含量与褪色比例有较好的相关性,但是对于整个河段

的研究来说,两者的相关性不明显,有机质对于褪色比例的影响不明确(表4及图2).有机质含量与褪色比例尽管能在某一些特定环境下表现出强相关性,但是却并不能用统一的方式描述出来.这些结果表明在沉积物中,有机质含量并不是影响染色效果的唯一因素.在其它条件如粒径组成改变的情况下,它对染色效果的影响也可能不一致.

2.4.2 褪色比例与褪色前细菌数量的相关性

褪色前每 g 干沉积物中的细菌数量与褪色比例有较好的相关性($r = 0.614$, $p = 0.004$),同有机质与褪色比例关系类似,去掉表层数据后其相关性有明显增高($r = 0.727$, $p = 0.001$)(见图3).褪色部分受原细菌数量直接影响,细菌数量多者,误染色的几率就大,褪色的比例也就相对高.这就说明在细菌数量相对于该类型沉积物而言偏高的时候,有必要考虑在荧光染色计数后,增加褪色步骤以获得准确的数据.



Y: 褪色比例; TB: 第一次细菌计数数量

图3 沉积柱褪色比例与褪色前细菌数量关系

Fig. 3 Relationships between Y and the total count with and without the surface layer

2.4.3 褪色比例与粒径组成的关系

在本实验中,黏粒在粒径组成中所占的比例与褪色比例无明显相关性(表4, $r = 0.071$),但与有机质含量有明显相关($r = 0.764$, $p < 0.01$).

粒径组成直接影响有机质的传送和分布.而有机质是细菌生长的物质基础,它也同时影响褪色比例.本研究在消除粒径组成差异的条件下分析了有机质含量和褪色比例的偏相关性,结果显示有机质含量与褪色比例的偏相关性比相关性好($r = 0.416$, $p = 0.076$).这表明粒径组成是通过影响有机质来实现其对褪色比例的影响,也与前人的研究推测 DAPI 会将碎石等颗粒物染色的结果相似^[5, 24].

2.4.4 褪色比例各相关因素的回归分析

为了表征有机质含量、细菌数量和黏粒含量对褪色比例的综合影响,本研究对这4个变量进行了多元回归分析,得到回归方程如下:

$$Y = 2.816X_1 + 3.187 \times 10^{-8}X_2 + 3.604X_3 - 29.142 \quad (2)$$

式中, Y 为褪色比例(%); X_1 为有机质含量(%); X_2 为每 g 干沉积物中的细菌数量; X_3 为黏土比例(%)($r = 0.694$, $p = 0.013$).

在褪色比例与各相关因素的回归分析中,计算值与实测值有较好的吻合度.一般在褪色比例 < 30% 时褪色效果不显著,而在 > 30% 时将会影响细菌数量的准确计数,它将低估了细菌的活性水平,对营养盐循环等相关理化条件的分析造成偏差,这种情况下,需要在荧光染色后增加褪色步骤^[6, 11].因此

笔者建议,在决定 DAPI 荧光染色计数法是否需要增加褪色步骤以作修正时,可以根据当地的有机质含量、褪色前细菌数量及粒径组成,作出回归分析,先计算出褪色比例。为了保持数据的均衡性和稳定性,选择在大部分样品褪色比例均超过 30%,或小部分样品褪色比例特别高时,需要考虑褪色步骤。这样能减少重复性工作,在样品数量较多时尤为适用。

在本实验研究的珠江广州河段中,计算值显示,70%的样品的褪色比例都超过 30%,因此有必要进行褪色。由于沉积物的性质极度的不均一,本实验得出的回归方程适用于颗粒组成以细粒子黏粒和粉砂($<50\ \mu\text{m}$)为主,有机物含量 5% 左右的沉积物。这类沉积物在国内外分布广泛,一般出现在受过人为污染的河流和湖泊^[25 26],这说明了本研究的适用性较广。在研究不同沉积物时,如富营养化程度高的湖泊中(沉积物有机质含量约 18%)则进行褪色步骤是必要的^[6],而在一些有机质含量低的深海则褪色效果不一定明显,但由于有机质与粒径的关系复杂,因此在做褪色效果与影响因素关系的研究时,需要先对参数系数进行调整。

3 结论

(1)本研究对 DAPI 荧光染色计数法的感潮河段沉积物测量影响因素进行了分析,染色因素包括三方面内容并给出相应的处理方法:首先是沉积物的异质性,需通过适当的稀释和超声方法将沉积物均质化;第二是 DAPI 染色效果,需确定最佳的 DAPI 染色剂的浓度和染色时间;第三是细菌和杂质的含量,需根据其多少在传统的 DAPI 染色步骤的基础上决定是否加入异丙醇褪色步骤。

(2)对感潮河段沉积物稀释 2 000 倍,超声 10 min,DAPI 浓度为 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,染色时间 30 min 以上时可以得到最佳细菌计数数量。有机质含量、褪色前细菌数量和粒径组成都是 DAPI 荧光染色计数的影响因素。褪色比例受褪色前细菌数量影响最大;有机质含量对褪色细菌比例的影响也比较大,这是因为有机质一方面会影响细菌的分散,降低染色效果,另一方面,有机物本身也会被 DAPI 误染色;土壤粒径组成通过影响有机质的传输和团聚而间接影响褪色比例。将褪色比例与有机质含量、细菌数量及黏粒比例进行回归分析,这一方法可以较迅速判断褪色步骤是否必要,但由于沉积物具有高度异质性,在研究不同沉积物时,可能需要对影响参数的数量和参数数值进行调整。

参考文献:

- [1] Zweifel U L, Hagstrom A. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts) [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** (6): 2180-2185.
- [2] Kepner R L, Pratt J R. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present [J]. *Microbiol Rev*, 1994, **58** (4): 603-615.
- [3] Griebler C, Mindl B, Slezak D. Combining DAPI and SYBR Green II for the enumeration of total bacterial numbers in aquatic sediments [J]. *Internat Rev Hydrobiol*, 2001, **86**: 453-465.
- [4] Quéric N V, Soltwedel T, Arntz W E. Application of a rapid direct viable count method to deep-sea sediment bacteria [J]. *J Microbiol Methods*, 2004, **57**: 351-367.
- [5] Gough H L, Stahl D A. Optimization of direct cell counting in sediment [J]. *J Microbiol Methods*, 2003, **52**: 39-46.
- [6] Haglund A L, Lantz P, Törnblom E, *et al.* Depth distribution of active bacteria and bacterial activity in lake sediment [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, **46**: 31-38.
- [7] Lunau M, Lemke A, Walther K, *et al.* An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy [J]. *Environ Microbiol*, 2005, **7** (7): 961-968.
- [8] Karner M, Fuhrman J A. Determination of active marine bacterioplankton: a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography, and nucleoid staining [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63** (4): 1208-1213.
- [9] Fischer H, Wanner S C, Pusch M. Bacterial abundance and production in river sediments as related to the biochemical composition of particulate organic matter (POM) [J]. *Biogeochemistry*, 2002, **61**: 37-55.
- [10] Luna G M, Manini E, Danovaro R. Large fraction of dead and inactive bacteria in coastal marine sediments: comparison of protocols for determination and ecological significance [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (7): 3509-3513.
- [11] Polymenakou P N, Fragkioudaki G, Tselepidis A. Bacterial and organic matter distribution in the sediments of the Thracian Sea (NE Aegean Sea) [J]. *Cont Shelf Res*, 2007, **27**: 2187-2197.
- [12] Dinehart R L, Burau J R. Repeated surveys by acoustic Doppler current profiler for flow and sediment dynamics in a tidal river [J]. *J Hydrol*, 2005, **314**: 1-21.
- [13] Freitag T E, Chang L, Prosser J I. Changes in the community structure and activity of betaproteobacterial ammonia-oxidizing sediment bacteria along a freshwater-marine gradient [J]. *Environ Microbiol*, 2006, **8** (4): 684-696.
- [14] 牛红义, 吴群河, 陈新庚. 珠江广州河段沉积物中营养物质的分布特征及粒度效应 [J]. *水土保持通报*, 2007, **27** (5): 17-21.
- [15] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978. 62-135.
- [16] Schallenberg M, Kalff J, Rasmussen J B. Solutions to problems in enumerating sediment bacteria by direct count [J]. *Appl*

- Environ Microbiol, 1989, **55**(5):1214-1219.
- [17] Ramalho R, Cunha J, Teixeira P, *et al.* Improved methods for the enumeration of heterotrophic bacteria in bottled mineral waters [J]. J Microbiol Methods, 2001, **44**:97-103.
- [18] Neto M, Ohannessian A, Delolme C, *et al.* 2007. Towards an optimized protocol for measuring global dehydrogenase activity in storm-water sediments [J]. J Soils Sediments, 2007, **7**(2): 101-110.
- [19] Dong H, Zhang G, Jiang H, *et al.* Microbial diversity in sediments of saline Qinghai Lake, China: linking geochemical controls to microbial ecology [J]. Microbiol Ecol, 2006, **51**:65-82.
- [20] Fan L F, Shieh W Y, Wu W F, *et al.* Distribution of nitrogenous nutrients and denitrifiers strains in estuarine sediment profiles of the Tanshui River, northern Taiwan [J]. Estuar Coast Shelf S, 2006, **69**:543-553.
- [21] Margesin R. Permafrost Soils [M]. Springer Berlin Heidelberg Press, 2009. 153-154.
- [22] Huettel M, Gust G. Impact of bioroughness on interfacial solute exchange in permeable sediments [J]. Mar Ecol Prog Ser, 1992, **89**:253-267.
- [23] Qu  ric N V, Soltwedel T. Impact of small-scale biogenic sediment structures on bacterial distribution and activity in Arctic deep-sea sediments [J]. Mar Ecol, 2007, **28** (Suppl. 1):66-74.
- [24] Porter K G, Feig Y S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora [J]. Limnol Oceanogr, 1980, **25** (5):943-948.
- [25] 冯峰,王辉,方涛,等. 东湖沉积物中微生物量与碳、氮、磷的相关性[J]. 中国环境科学, 2006, **26**(3):342-345.
- [26] Jafvert C T, Lane D, Lee L S, *et al.* Partitioning of mono-and polycyclic aromatic hydrocarbons in a river sediment adjacent to a former manufactured gas plant site [J]. Chemosphere, 2006, **62**:315-321.