

FISH 荧光原位杂交技术在污水生物脱氮研究中的应用*

邓黛青 李光明 周仲原 胡晨燕

(同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室 上海 200092)

摘要: 简要介绍了荧光原位杂交 (FISH) 的基本原理, 着重讨论近年来该技术在污水生物脱氮研究中的应用现状和特点。研究表明: FISH 技术能够准确地表现污水处理反应器中脱氮菌群落的类型和结构形态。但在关于 SRT、DO、C/N 比等工艺参数的变化对脱氮反应器中微生物类型、数量和结构的影响等方面的研究还有待深入。FISH 技术与 PCR-DGGE 和 16S rRNA/rDNA 序列分析等技术相结合是对污水处理构筑物中生物脱氮群落深入研究的发展方向。

关键词: 荧光原位杂交, 污水生物处理, 脱氮

中图分类号: X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0132-05

Application of Fluorescence in Situ Hybridization in Research on Biological Removal of Nitrogen from Wastewater*

DENG Dai-Qing LI Guang-Ming ZHOU Yang-Yuan HU Chen-Yan

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092)

Abstract: After brief introduction of FISH (fluorescence in situ hybridization), it was discussed of the FISH's application status in research on biological nitrogen removal in recent years. Base on the FISH technology, Characterization of the community in biological reactor could be showed exactly, but more research should be carried out for the study on the effluence on microbial community composition, which was caused by changing operating parameter of biological reactors on the microbial community composition, such as SRT, DO and C/N ratio. The combination of FISH and other methods such as PCR-DGGE and 16S rRNA/rDNA will led to the identification of the microbial community which response for the nitrogen-removal in wastewater treatment plant.

Key words: FISH (Fluorescence Inin Situ Hybridization), Biological wastewater treatment, Nitrogen removalalremoval

在上个世纪, 人们以硝化作用和反硝化作用为基础, 构建了废水生物脱氮体系。一直以来, 人们对生物脱氮反应过程中的微生物研究仅局限于传统微生物学的研究, 如纯培养、MPN (Most Probable Number) 计数等, 而亚硝化细菌、硝化细菌或厌氧氨氧化菌生长缓慢, 分离纯化困难或至今尚未分离得到纯菌株, 更影响了对这类微生物深入研究, 使得生物脱氮反应器中复杂的微生物群落结构和群落动态长期以来都是以灰箱模型存在。近 10 年来, 随着 PCR、核酸测序等现代分子生物技术的发展, 快速准确地鉴定细菌成为可能。在环境微生物学中, 已经开始应用这些技术对各种生境中的群落生态演替规律、种群数量波动等进行检测。其中荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术是应用广泛、最为有效的技术之一。

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2003AA644030)

通讯作者 Tel: 13918196998, E-mail: lilly-deng@163.com

收稿日期: 2005-07-11, 修回日期: 2005-09-06

1 FISH 技术简介

FISH 技术是在同位素原位杂交技术基础上发展起来的非放射性原位杂交方法,问世于 20 世纪 70 年代后期。它以荧光染料标记的 16S rDNA 和 16S rRNA 寡核苷酸序列作为探针,按照两个核酸的碱基序列互补原则,将标记的探针直接原位杂交到染色体或 DNA 纤维切片上,由于与荧光素分子偶联的单克隆抗体和探针分子特异性结合,能激发杂交探针的荧光信号,通过荧光检测系统和图形分析技术对染色体或 DNA 纤维上的 DNA 序列进行定位、定性和相对定量分析,就能实现原位样品中的目标细菌的探测。由不同细菌的 16S rDNA 都有其独特的序列,利用这些独特序列制成的探针,可以鉴别或跟踪自然样品中的目标细菌。因而利用 FISH 技术不仅可以鉴定和定量分析特异微生物,还可用于诊断微生物群落结构与群落动态;结合其它研究手段,还可用于研究复杂环境中的原位基因表达,如启动子诱导及其表达的时序进程、生物膜上微生物的空间分布、混合菌群中特定生物的代谢活性等。

2 生物脱氮研究常用的寡核苷酸探针

FISH 技术的探针要求必须具有较好的特异性、灵敏性和良好的组织渗透性。根据需要合成的 DNA 或 RNA 寡核苷酸探针可识别靶序列内一个碱基的变化,能够用酶学或化学方法进行非放射性标记。表 1 中列出了在研究中和应用设计的一些亚硝酸氧化菌和氨氧化菌的寡核苷酸探针。

表 1 部分亚硝酸氧化菌和氨氧化菌的特异寡核苷酸探针

探针	序列(5'-3')	特异性	参考文献
EUB338	GCTGCCTCCGTTSCGAGT	真细菌	[1~3]
ALF1b	CGTTCGYTCTGAGCCAG	变形菌纲-α 亚纲和 δ 亚纲, 硝化螺菌属,螺菌属	[2,3]
BET42a	GCCTTCCCACITTCGTTT	变形菌纲-β 亚纲	[2,3]
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	变形菌纲-γ 亚纲	[2,3]
NSO-190	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	氨氧化菌,变形菌纲-β 亚纲	[1,4]
NSV-443	CCGTGACCGTTTCGTTCGG	亚硝化螺菌属	[4~6]
NSM156	TATTAGCACATCTTTTCGAT	亚硝化单胞菌属	[4~6]
NIT-3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	硝化杆菌属	[4]
NSR-826	GTAACCCGCCGACACTTA	淡水硝化螺菌属	[6]
CF319a	TGGTCCGTRTCTCAGTAC	吞噬性产黄菌属	[2,3,7]
LGC354A	TGGAAGATTCCCTACTGC	革兰氏阳性,低 GC 碱基菌	[3]
LGC354B	CGGAAGATTCCCTACTGC	革兰氏阳性,低 GC 碱基菌	[3]
LGC354C	CCGAAGATTCCCTACTGC	革兰氏阳性,低 GC 碱基菌	[3]
Clw844	GCTGCGTTACTCACTTCAT	<i>Colwellia</i>	[3]
PSMg43	CTTCCTCCCAAC	假单胞菌属	[3]
Hlm474	CTCTGGGTGATGTCCTTCC	<i>Halomonas</i>	[3]
Amx-0820-a-A-22	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	厌氧氨氧化菌	[8~12]
NSO1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA-	亚硝酸细菌	[8~10]
Neu-653	CCCCICTGCTGCACITCTA	亚硝化单胞菌属	[11]

3 用于研究脱氮反应器内微生物的种群结构

基于 rRNA 的分析技术例如核酸抽提和 PCR 扩增都有一定程度的偏差, FISH 技术则可以将整体微生物环境清晰地呈像出来而不需要额外的抽提和扩增等易引起偏差的步骤。因而, FISH 技术被广泛应用于环境微生物种群的结构形态研究。

Helmer 等^[8]以 NSO1225 探针和 Amx-0820-a-A-22 探针分别对生物膜内细菌进行了 FISH 检测, 发现亚硝酸细菌主要分布于生物膜的好氧表层, 而厌氧氨氧化菌 (*Kuene-
nia stuttgartiensis*) 则主要分布于生物膜的缺氧内层。Michael 等^[9]用同样探针对 CANON (Completely Autotrophic Nitrogen Over Nitrite) 反应器中的颗粒污泥进行研究时也发现了类似的结果 (图 1)。应用 FISH 技术, 结合相差显微镜和共聚焦显微镜的图像叠加 Schramm 等^[10]对硝化流化床反应器中活性污泥内硝化细菌的空间分布进行原位分析。实验结果显示了氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化细菌紧密结合在一起的形态特征。Ingo Schmidt 等^[11]在研究好氧与厌氧氨氧化菌的生存关系时发现 *Kuenenia stuttgartiensis* 和 *Brocadia anammoxidans* Dokhaven 紧密结合在一起的形态特征 (图 2)。

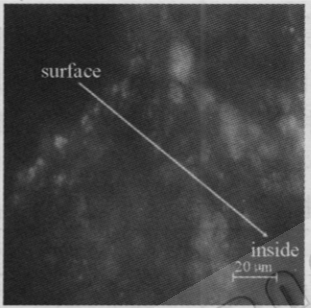


图 1 CANON 反应器中的颗粒污泥^[9]

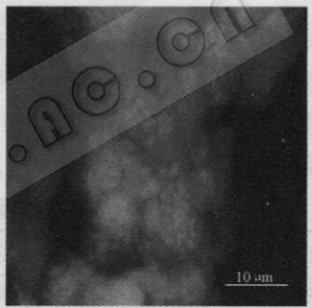


图 2 两种厌氧氨氧化污泥的共存形态^[11]

Jang 等^[5]用 Nsm156 作为探针研究序批式反应器中的好氧颗粒污泥的群落结构特征时发现: 颗粒污泥中的氨氧化菌含量很高, 但氨氧化菌在颗粒污泥上的分布并不均匀, 大部分氨氧化菌集结成球状, 少量氨氧化菌甚至深入到颗粒污泥的缺氧区 (图 3)。这一研究结果表明颗粒污泥中的氨氧化菌含量可能高于絮状活性污泥, 从而可以实现更高的氨负荷。

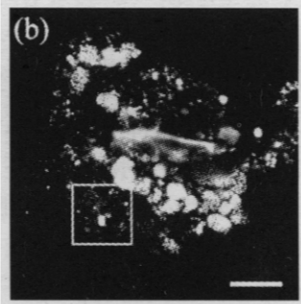
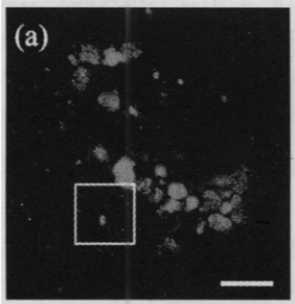


图 3 氨氧化菌在人工培养颗粒污泥上的分布图^[5]

(a) 真菌红色, (b) 亚硝化单胞菌属绿色

Silyn 等^[6]对废水处理湿地生物进行了研究, 结果也表明亚硝化单胞菌是其生物膜

上的主要氨氧化细菌。Kazuaki 等^[1]用 EUB338、NSO190、NIT3 和 NSR1156 等探针研究了同时硝化反硝化好氧膜生物反应器中生物膜上的菌群结构,结果表明氨氧化菌是生物膜中的优势菌群,而亚硝酸盐氧化菌则未被检出。Han-Woong Lee 等^[2]用 EUB338 作为一级探针,ALF1b, BET42a, GAM42a 和 CF319a 作为二级探针对两个不同脱氮反应器活性污泥中的分子生物学特征进行了定量研究,结果(图 4)表明变形菌纲-β 亚纲(图 4A)是反应器中的优势菌群,变形菌纲-γ 亚纲(图 4C)是反应器中的第二大优势菌群。

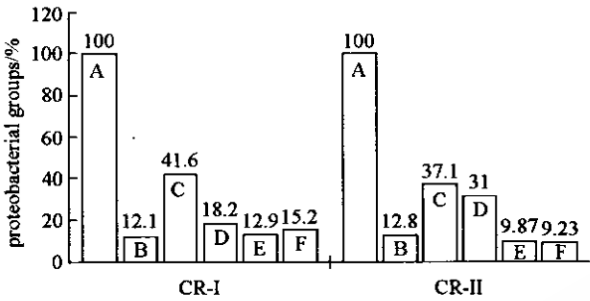


图 4 两个反应器中脱氮活性污泥中的群落结构比较^[8]

4 用于环境中微生物变化的动态监测

由于可以同时多份样品进行分析, FISH 技术不仅能提供静止的实验结果,还可以动态地观察流动水体中的微生物种群变化,因此 FISH 技术被用于监测环境中微生物在时间或空间上的动态变化,以帮助人们理解环境中微生物种群的组成和生长动力学。

张 丹等^[4]研究了 OLAND (Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification) 反应器中硝化菌群随溶氧浓度降低的变化规律,结果表明:随着溶解氧浓度的逐渐降低,氨氧化菌的数量基本稳定在 70% 左右,而亚硝酸氧化菌的数量略有降低,从 13% 下降到 10.5%,但并不明显。Slikers 等^[12]采用 FISH 技术对 CANON 工艺调试过程中的优势菌种变化进行研究(图 5),结果表明:在厌氧运试阶段,以亚硝酸菌或硝酸菌的核酸探针检测,没有在污泥中检出亚硝酸细菌和硝酸细菌(检测限 1%),以厌氧氨氧化细菌的核酸探针检测,大部分细胞呈阳性反应,污泥中的厌氧氨氧化菌占 80% 左右;在限氧运行 7 周后,同等测试结果显示活性污泥中的亚硝酸菌与厌氧氨氧化菌所

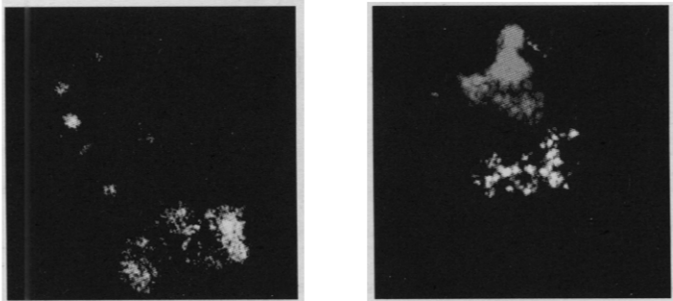


图 5 CANON 反应器内絮状物在不同 DO 条件下的菌群结构^[11]

(左图) 厌氧条件下只有厌氧氨氧化菌, (右图) 供氧条件下厌氧氨氧化菌和亚硝酸单胞菌共存

占的百分率分别为 45% 和 40%，而硝酸菌则未被检出。由此推断：在限氧条件下，硝酸细菌不能与亚硝酸细菌竞争氧，也不能与厌氧氨氧化菌竞争亚硝酸盐。

Sachiko 等^[3]用自己设计的 Clw844、PSMg43、Hlm474 等探针对含盐废水处理脱氮系统中的生物群落进行了定量研究。分别探测了处于不同的脱氮效果下反应器运行的第 167 天、258 天和第 397 天的群落结构，结果表明，Hlm474 探针所代表的 *Halomonas. sp* 是反应器能实现脱氮最重要的菌属。

5 结论与展望

FISH 技术是一门在医学领域中已较成熟的检测技术，近年来才渗透到环境科学与工程领域研究中，国内在污水脱氮应用 FISH 进行的研究还不多。已有文献表明，FISH 技术能够准确地实现反应器中脱氮功能菌的识别，真实地表达污水处理构筑物中脱氮菌落的结构形态，但在关于 SRT、DO、C/N 比等工艺参数的变化对反应器中微生物类型、数量和结构的影响等方面的研究还有待深入。FISH 与 PCR-DGGE 和 16S rRNA/rDNA 序列分析等技术相结合是对污水处理构筑物中生物脱氮群落进一步研究的发展方向。

参考文献

- [1] Kazuaki H, Akihiko T, Satoshi T, *et al.* Journal of Biotechnology, 2003, **100** (1): 23 ~ 32.
- [2] Han Woong L, Soo-Y L. FEMS Microbiology Ecology, 2002, **41** (2): 85 ~ 94.
- [3] Sachiko Y, Naohiro N, Satoshi T, *et al.* FEMS Microbiology Letters, 2004, **235** (1): 183 ~ 189.
- [4] 张 丹, 刘耀平, 徐 慧, 等. 应用与环境生物学报, 2003, **9** (5): 530 ~ 533.
- [5] Am Jang, Young Han Yoon, In S Kim, *et al.* Journal of Biotechnology, 2003, **105** (2): 71 ~ 82.
- [6] Silyn R G, Lewis G. Water Research, 2001, **35** (11): 2731 ~ 2739.
- [7] Manz W, Amann R. Microbiology, 1996, **142** (1): 1097 ~ 1106.
- [8] Helmer C, Kunst S. Water Science and Technology, 1999, **39** (7): 13 ~ 21.
- [9] Michael N, Annette B, Olav S, *et al.* FEMS Microbiology Ecology, 2005, **51** (2): 247 ~ 256.
- [10] Schramm A, Larsen L H, Revsbech N P, *et al.* Water Science and Technology, 1997, **36** (1): 263 ~ 270.
- [11] Schmidt I, Sliemers O, Schmid M, *et al.* FEMS Microbiology Reviews, 2003, **27** (4): 481 ~ 492.
- [12] Olav S, Derwort N, Campos G J L. *et al.* Water Research, 2002, **36** (10): 2475 ~ 2482.
- [13] Kuenen J G, Jetten M S M. ASM NEWS, 2001, **67** (9): 456 ~ 463.