

# MAR-FISH 技术及其在环境微生物群落与功能研究中的应用

王晓慧 文湘华\*

(清华大学环境科学与工程系 北京 100084)

**摘要:** 对复杂环境中微生物群落结构和功能的研究是微生物生态学的重要任务。尽管现代分子生物学技术已经成功地用于解析环境中微生物的群落结构,但是这些方法并不能提供微生物的原位生理学信息。而一种新的方法,微观放射自显影和荧光原位杂交集成技术(MAR-FISH)则能够同时在单细胞水平上,检测复杂环境中微生物的系统发育信息及其生理特性。本文总结了 MAR-FISH 方法的原理,实验步骤及其在环境微生物群落与功能研究中的应用。

**关键词:** MAR-FISH, 微生物群落结构, 原位活性

## MAR-FISH Technique and Its Application in Study of Environmental Microbial Community and Function

WANG Xiao-Hui WEN Xiang-Hua\*

(Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** The major goal of microbial ecology is to study the structure and function of complex microbial communities. New molecular biological techniques have been successfully applied to analyze microbial community structure. However they do not provide information on the physiologic properties of the detected microorganisms. A new tool for structure-function analyses in microbial ecology, microautoradiography combined with fluorescence in situ hybridization (MAR-FISH) can be used to simultaneously examine the phylogenetic identity and the specific activity of microorganisms within a complex microbial community at a single-cell level. This article reviews the principle, experimental steps of MAR-FISH technique. The application of this technique in study of the environmental microbial community and function is also summarized.

**Keywords:** Microautoradiography combined with fluorescence in situ hybridization (MAR-FISH), Microbial community, In situ activity

对微生物群落结构和功能的研究是微生物生态学的重要任务。然而传统微生物研究方法是以分离培养为基础的,许多研究已经证实,通过传统的分

离方法鉴定的微生物只占环境微生物总数的 0.1%~10%<sup>[1]</sup>,远远不能满足微生物生态学研究的需要。近年来,基于 16S rRNA 基因的现代分子生物学诊断

技术的出现,提供了更快速、更准确地描述环境中微生物群落结构的有效方法,如荧光原位杂交(FISH)、克隆测序、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、末端限制性片段多态性技术(T-RFLP)等,这些技术在微生物生态学中的应用揭示了环境中微生物群落结构的大量信息,但这些基于 16S rRNA 基因的分子生物学技术不能提供微生物的生理学信息。传统的培养方法虽能确定微生物在环境中的生理作用,但其在实验室中的培养条件下,微生物的生理特性不能准确反应其在环境中的原位生理特性<sup>[2]</sup>。而在研究微生物时,不管是研究微生物的富集培养和分离,还是研究微生物技术的应用都需要在了解微生物分类鉴定的同时,了解微生物的各种功能特性。

上世纪末 Nielsen 等人<sup>[3,4]</sup>提出了一种新技术,即荧光原位杂交和微放射自显影集成技术 MAR-FISH(microautoradiography fluorescence in situ hybridization),也有称其为 STAR-FISH(substrate tracking autoradiography fluorescence in situ hybridization), Micro-FISH (microautoradiography fluorescence in situ hybridization)等。这些方法只是在细节上有稍微差别,基本原理是一样的<sup>[5]</sup>。应用 MAR-FISH 能同时获得复杂环境中特定微生物的种属和功能特性,从而更好地了解特定微生物在环境中的作用,更清楚地认识微生物群落结构及其与微环境的相互关系。本文总结了 MAR-FISH 方法的原理,实验步骤及其在环境微生物群落与功能研究中的应用。

## 1 MAR-FISH 技术

### 1.1 MAR-FISH 原理

MAR-FISH 技术中涉及 FISH 和 MAR 两项技术。FISH 的基本原理为:将寡核苷酸探针用荧光染料标记,再使之与固定在载玻片上的微生物样品杂交,将未杂交的荧光探针洗去后,用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)或普通荧光显微镜进行观察。微放射自显影(MAR)的基本原理为:通过将微生物样品与放射性示踪剂或者放射性标记的底物培养后,具有吸收这种底物的活性微生物就会将放射性化合物吸收到体内。经过适当的样品处理后,放射性标记的样品被放置在载玻片或盖玻片上,并与放射性敏感的感光乳剂接触。在一定时间的培养过程中,来自放射性样品的发射信号与悬浮在感光乳剂中的

溴化银晶体接触。根据标准照相步骤冲洗感光乳剂时,就会在放射性结构上面显现出黑色银粒,并可通过显微镜清晰观察到<sup>[5]</sup>。在六十年代中期, Brock 首次采用放射自显影技术来测定微生物的营养需求和生长率。随后,这项技术被多次用来检测微生物的原位代谢活性。然而,由于研究的微生物种类缺乏形态学上的特点,因此很难将其功能和特定的微生物种类联系在一起<sup>[5]</sup>。而 MAR 和 FISH 的结合,可以成功的将微生物的功能与特定的种属联系起来。

### 1.2 MAR-FISH 步骤

根据试验过程,典型的 MAR-FISH 可以分为 5 步:(1)样品培养;(2)样品固定;(3)FISH;(4)MAR;(5)显微观测。Lee 等<sup>[3]</sup>认为,FISH 步骤放在 MAR 之前,可以获得更强的荧光信号。

**1.2.1 样品培养:** MAR-FISH 的第一步,需将所检测样品加入放射性底物进行培养。根据不同的环境样品及需要,可以选用不同的厌氧、好氧等培养条件。在这一步中,样品生物量,放射物质加入量,背景物质的放射水平,电子供体和受体,培养时间等对 MAR-FISH 均有重要影响。一个典型的样品一般体积为几毫升,微生物浓度为 1 g/L~2 g/L,放射物质浓度为 1  $\mu$ Ci/mL~25  $\mu$ Ci/mL。同时在试验中,应采取阴性对照。阴性对照中可以加入特异的抑制物来抑制微生物的活性。如钼酸盐  $\text{MoO}_4$  和 bromoethanesulfonic(BES)可以分别抑制硫酸盐还原<sup>[6]</sup>和甲烷发酵<sup>[7]</sup>,而 arylethiourea(ATU)可以很好的抑制硝化活性<sup>[5]</sup>。此外,每个样品应做 2 或 3 个平行实验。为了在 MAR 中获得单细胞的分辨率,选择适当的底物和同位素非常重要。弱的  $\beta$  射线发射源比如  $^3\text{H}$  和  $^{14}\text{C}$  可以获得更好的空间分辨率,可以达到 0.5  $\mu\text{m}$ ~2  $\mu\text{m}$ 。 $^{33}\text{P}$  经常用来检测聚磷菌(PAOs)。尽管  $^{35}\text{S}$  还没报道,但它可能可以用于硫氧化菌的检测<sup>[5]</sup>。

**1.2.2 样品固定:** 样品通常用 4%的多聚甲醛在 4 $^{\circ}\text{C}$  固定 3 h,然后离心漂洗 3 次(14000 g, 10 min),洗去多余的放射物质。点样于明胶包埋的盖玻片上,空气中风干,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥保存。对于生物膜样品需在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下切片处理,切片厚度为 5  $\mu\text{m}$ ~10  $\mu\text{m}$ 。每个切片应当放于明胶或者 L-赖氨酸包备的盖玻片上过夜,依次用 50%, 80%, 98% (质量分数)乙醇室温下脱水 3 min。

**1.2.3 FISH:** FISH 的基本原理前面已经叙述,其基

本步骤为<sup>[8]</sup>: (1) 样品在载玻片上固定并用乙醇脱水; (2) 寡核苷酸探针杂交: 一般在 46°C 下杂交 1 h~3 h; (3) 样品清洗: 用 48°C 水浴的清洗液清洗。值得说明的是染料 Cy-3 和 Cy-5 标记的探针, 可以获得更强的荧光信号, 而 Alexa 标记的探针具有更加持久的信号<sup>[5]</sup>。

**1.2.4 MAR-FISH 之后**, 盖玻片上的样品要涂上感光乳剂。一般对于 <sup>3</sup>H, 感光乳剂的厚度为 3 μm~4 μm, 已足够吸收所有的β粒子。而对于 <sup>14</sup>C, 则需要 10 μm~100 μm。曝光是影响 MAR 的一个重要因素。一般来说, 增加曝光时间可以获得更高密度的银颗粒, 曝光时间取决于所采用的放射性底物和吸收量, 一般是 2 d~6 d。而曝光时间过长, 则可能吸收来自背景物质的放射粒子, 导致假阳性。因此合适的曝光时间需要试验来确定。

**1.2.5 显微观察**: 样品最后可以到荧光显微镜上进行观测。对于 FISH, 采用共聚焦激光扫描显微镜可以获得更好的图像。

### 1.3 MAR-FISH 的不足

MAR-FISH 也存在一些缺陷, 主要体现在以下几个方面: (1) 费用高, 时间长, 实验繁琐, 实验的准确性和可重复性需要多次实验进行摸索, 需要掌握系统的知识; (2) 有些国家对于放射性同位素的使用有限制, 通常只能采用非常有限的几种, 如 <sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>33</sup>P 等; (3) 与荧光染色的细胞相比, 感光乳剂中非荧光染色银粒的三维分布不能通过 CLSM 准确地分析; (4) 加入的放射物质或许对微生物有影响, 而且可能不是环境中被测微生物的自然底物<sup>[5]</sup>。

## 2 MAR-FISH 技术应用研究

到目前为止, MAR-FISH 技术已经成功地应用到了环境微生物的研究中, 表 1 为 MAR-FISH 技术在微生物生态学应用中的总结。

### 2.1 丝状菌

污泥膨胀是污水处理厂运行管理的常见问题和难题, 原因之一是活性污泥中丝状菌过度生长。研究丝状菌种群及其功能特性, 可以帮助阐明影响丝状菌生长的因素, 从而有效控制污泥膨胀。MAR-FISH 已被用来检测工业和生活污水处理系统中活性污泥的丝状菌种群及功能特性。Nielsen 等

人<sup>[11]</sup>研究了不同环境条件下, 活性污泥中 *Thiothrix* spp.对 <sup>14</sup>C 标记的醋酸盐和 <sup>14</sup>C 标记的重碳酸盐的吸收特性。研究表明, *Thiothrix* spp.具有丰富的种群多样性, 具有无机自养, 异养和混合营养类型。*Thiothrix* spp.中混合营养菌的出现, 可能是导致活性污泥中 *Thiothrix* spp.的生长竞争过其它自养菌, 而导致污泥膨胀。Andreasen 等人<sup>[9,10]</sup>采用 MAR-FISH 技术研究了 *Microthrix parvicella* 在缺氧条件下的原位底物利用特性。研究表明, 只有长链脂肪酸, 包括油酸, 棕榈酸和三油酸在缺氧条件下能够被吸收利用。*Microthrix parvicella* 的这种原位特性可以为污泥膨胀提供更好的控制策略。Thomsen 等人<sup>[13]</sup>采用 MAR-FISH 技术研究了两个污水处理厂活性污泥中 0041 菌的生理特性。研究表明, 所有的 0041 菌均可以在缺氧和好氧条件下代谢葡萄糖, 但都不能代谢醋酸盐。两个污水处理厂的 0041 菌代谢特性没有明显差异。

### 2.2 聚磷菌(PAOs)

Lee 等人<sup>[17]</sup>采用 MAR-FISH 技术研究了某强化生物除磷(EBPR)污水厂中的 PAOs。研究表明, 主要聚磷菌为 β-proteobacteria(部分 *Rhodocyclus* 和部分未知菌)和 *Actinobacteria*。并非所有的 *Rhodocyclus* 都可以吸收磷, 这表明部分 *Rhodocyclus* 没有活性, 或者这个属中有其它非聚磷菌。Kong 等人<sup>[20]</sup>采用 MAR-FISH 及 PHA 染色法研究了某 SBR 反应器中的微生物, 研究表明 *Rhodocyclus* 可以在好氧条件下吸收醋酸盐和合成 PHAs, 在厌氧条件下吸收磷, 在系统中并没有发现 *Acinetobacter* spp.的存在。Cuha 等人<sup>[2]</sup>采用 MAR-FISH 技术, 研究了四个 EBPR 污水厂中, *Rhodocyclus* 的底物利用模式。研究表明 4 个污水处理厂中 *Rhodocyclus* 具有相似的底物利用模式。在厌氧条件下, 都能利用醋酸盐、天门冬氨酸盐、谷氨酸盐, 但不能利用棕榈酸盐。与 PAOs 相关的 *Rhodocyclus* 菌除了能利用醋酸盐外还具有利用氨基酸的能力, 这可能有利于它们在 EBPR 活性污泥中成为优势菌种。

### 2.3 硝化菌

Daims 等人<sup>[16]</sup>研究了活性污泥中不可培养的一类 *Nitrospira* 和亚硝酸盐氧化菌(NO<sub>2</sub>-oxidizing bacteria)。研究表明, 这些菌可以同时固定重碳酸盐和丙酮酸盐, 但不能吸

表 1 MAR-FISH 技术在微生物生态学中的应用  
Table 1 Application of MAR-FISH in microbial ecology

目标微生物和微生物群落 Target microorganisms and microbial community	所用的荧光标记底物 Radio-labeled substrates used	参考文献 Reference
<b>引起污泥膨胀的丝状菌 Filamentous bacteria related to sludge bulking</b>		
Filamentous bacteria	[ <sup>14</sup> C]乙酸盐, [ <sup>3</sup> H]葡萄糖, [ <sup>3</sup> H]乙醇, [ <sup>3</sup> H]氨基乙酸, [ <sup>3</sup> H]亮氨酸, [ <sup>3</sup> H]油酸	[3]
<i>Microthix parvicella</i>	[ <sup>14</sup> C]乙酸盐, [ <sup>14</sup> C]丙酸盐, [ <sup>14</sup> C]丁酸盐, [ <sup>3</sup> H]葡萄糖, [ <sup>14</sup> C]乙醇, [ <sup>3</sup> H]氨基乙酸, [ <sup>3</sup> H]亮氨酸, 等	[9]
<i>Microthix parvicella</i>	[ <sup>14</sup> C]油酸, [ <sup>3</sup> H]trioletic acid, [ <sup>14</sup> C]乙酸盐	[10]
<i>Thiothrix</i> spp.	[ <sup>3</sup> H]乙酸盐, [ <sup>3</sup> H]丁酸盐, [ <sup>14</sup> C]重碳酸盐	[11]
<i>Microthix parvicella</i>	[ <sup>14</sup> C]油酸	[12]
Type0041 和 TM7(未命名丝状菌)	[ <sup>3</sup> H]乙酸盐, [ <sup>3</sup> H]葡萄糖, [ <sup>3</sup> H]半乳糖, [ <sup>3</sup> H]甘露糖, [ <sup>3</sup> H]氨基乙酸, [ <sup>3</sup> H]亮氨酸, [ <sup>14</sup> C]油酸	[13]
<i>Thiothrix</i>	[ <sup>3</sup> H]乙酸盐	[14]
<i>Thiothrix</i>	[ <sup>14</sup> C]乙酸盐, [ <sup>3</sup> H]乙酸盐, [ <sup>3</sup> H]葡萄糖	[15]
<b>污水处理中的微生物群落 Microbial communities in wastewater treatments</b>		
纯培养微生物和活性污泥 Pure culture microorganisms and activated sludge	[ <sup>3</sup> H]葡萄糖, [ <sup>14</sup> C]乙酸盐, [ <sup>14</sup> C]丁酸盐, [ <sup>14</sup> C]重碳酸盐, 33Pi	[3]
亚硝化螺菌 <i>Nitrospira</i>	[ <sup>14</sup> C]重碳酸盐, [ <sup>3</sup> H]乙酸盐, [ <sup>14</sup> C]丙酸盐, [ <sup>14</sup> C]丁酸盐, [ <sup>14</sup> C]丙酮酸盐	[16]
聚磷菌 Phosphate-accumulation organisms(PAOs)	[ <sup>33</sup> P]磷酸盐	[17]
铁还原菌 Iron-reducing bacteria	[ <sup>14</sup> C]乙酸盐, [ <sup>3</sup> H]乙酸盐	[18]
硫酸盐还原菌 Sulphate-reducing bacteria(SRB)	[ <sup>14</sup> C]乙酸盐, [ <sup>14</sup> C]丙酸盐, [ <sup>14</sup> C]丁酸盐, [ <sup>14</sup> C]重碳酸盐, [ <sup>14</sup> C]甲酸盐	[19]
聚磷菌 Phosphate-accumulation organisms(PAOs)	[ <sup>33</sup> P]磷酸盐	[20]
污泥中的乙酸盐消耗菌 Acetate-consuming bacteria in activated sludge	[ <sup>3</sup> H]乙酸盐	[21]
生物膜中的硝化菌 Nitrifying bacteria in biofilm	[ <sup>14</sup> C]重碳酸盐, [ <sup>14</sup> C]乙酸盐, [ <sup>14</sup> C]NAG, [ <sup>14</sup> C]氨基酸	[22]
生物膜中的硝化菌 Nitrifying bacteria in biofilm	[ <sup>14</sup> C]重碳酸钠, [ <sup>14</sup> C]乙酸, [ <sup>3</sup> H]L-氨基酸, [ <sup>14</sup> C]NAG	[23]
聚磷菌 Phosphate-accumulation organisms(PAOs)	[ <sup>14</sup> C]乙酸钠, [ <sup>3</sup> H]棕榈酸, [ <sup>3</sup> H] L-天门冬氨酸, [ <sup>3</sup> H] L-谷氨酸	[2]
生物膜中利用甲醇微生物 Methanol-consuming bacteria in biofilm	[ <sup>14</sup> C] 甲醇	[24]
丙酸盐氧化菌 Propionate-oxidizing bacteria	[ <sup>14</sup> C] 丙酸盐, [ <sup>14</sup> C]丁酸盐	[25]
<i>Acinetobacter</i> spp. 和 <i>Rhodocyclus</i>	[ <sup>14</sup> C]葡萄糖, [ <sup>14</sup> C]丙酸钠, [ <sup>14</sup> C]丁酸钠, [ <sup>14</sup> C]乙酸钠	[26]
<i>Methylophilales</i>	[ <sup>14</sup> C]甲醇	[27]
<b>海洋中微生物 Microorganisms in marine samples</b>		
海洋浮游生物 Marine picoplankton	[ <sup>3</sup> H] D-葡萄糖, [ <sup>3</sup> H]氨基酸混合物	[28]
贫营养海水中的古菌 Archaea in oligotrophic marine samples	[ <sup>3</sup> H]氨基酸混合物	[29]
海洋沉积物中的 <i>Achromatium</i> <i>Achromatium</i> in marine sediment	[ <sup>14</sup> C]重碳酸, [ <sup>14</sup> C]乙酸盐	[30]
海洋样品 Marine samples	[ <sup>3</sup> H]氨基酸混合物, [ <sup>14</sup> C] N-乙酰基葡萄糖胺(NAG)	[31]
海洋样品 Marine samples	[ <sup>35</sup> S]DMSP	[32]
<b>其它 Others</b>		
异型生物降解菌 Xenobiotic-consuming bacteria	[ <sup>14</sup> C] o-硝基酚	[33]

收乙酸盐, 丁酸盐和丙酸盐。Kindaichi<sup>[22]</sup>采用 MAR-FISH 技术, 对以 NH<sub>4</sub> 为唯一能量来源的限碳自养硝化生物膜中, 硝化细菌和异养菌的生理生态

关系进行了研究。研究表明, 在生物膜系统中  $\alpha$ 、 $\beta$ -*proteobacteria* 主要利用乙酸盐和氨基酸。占总菌 2% 的 *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*(CFB)

占能消耗 N-乙酰基葡糖胺(NAG)菌的 64%。绿色非硫细菌占总氨基酸消耗菌的 9%和 NAG 消耗菌的 27%, 但是其不利用乙酸。不能确定种属的异养菌, 约占总异养菌的 6%, 它们能够利用所有的有机物, 包括 NAG。这个试验结果表明在这个自养硝化的生物膜结构中, 存在有效的食物网(碳代谢途径), 能够保证最大限度地利用硝化菌产生的溶解性微生物产物(SMP), 阻止硝化菌代谢产物或废物的积累。Okab<sup>[23]</sup>等人采用 MAR-FISH 技术进一步研究了, 以氨为能源重碳酸盐为唯一碳源的自养硝化生物膜中, 自养的硝化菌和异养菌的相互关系。试验表明, 硝化菌的代谢产物主要被属于 *Chloroflexi* 和 CFB 的丝状菌利用。另外, 实验表明  $\alpha$ 、 $\beta$ -*proteobacteria* 专门利用低分子量的有机物。

研究表明, 一些没有活性的氨氧化菌(AOB)在不利情况下, 体内可以积累大量 rRNA, 这给 FISH 的数据分析带来了一些困难, 而采用  $^{14}\text{C}$  标记的重碳酸盐 MAR-FISH 可以检测出具有代谢活性的 AOB<sup>[5]</sup>。

#### 2.4 反硝化菌

Ginige 等人<sup>[27]</sup>采用 MAR-FISH 技术研究了 SBR 反应器中以甲醇为碳源、硝酸盐为电子受体的反硝化微生物。首次报道了起反硝化作用的 *Methylophilales*, 且是反应器中的优势反硝化菌, 并推测 *Methylophilales* 也可能是生产规模反应器中重要的反硝化菌。Labbe<sup>[24]</sup>采用 MAR-FISH 技术, 研究了一个以甲醇为碳源的反硝化系统的群落结构, 并鉴定了利用甲醇的微生物。MAR-FISH 结果表明  $\alpha$ -*proteobacteria* 在硝酸盐存在的时候可以利用甲醇进行反硝化。尽管 *Methylophaga* spp. 有较高的丰度, 但是它们在这样的情况下不能吸收甲醇。

#### 2.5 硫循环相关菌

Ito 等人<sup>[19]</sup>研究了污水管道生物膜中硫酸盐还原菌(SRB)的代谢特性和其系统发育关系。MAR-FISH 技术表明, *Desulfobulbus* 是生物膜中主要的 SRB 菌。在以氧和硝酸盐为电子受体时, 吸收  $^{14}\text{C}$  标记的丙酸盐的 *Desulfobulbus* 分别占 9%和 27%。

Gray 等人<sup>[30]</sup>采用 MAR-FISH 技术研究了自然环境环境中 *Achromatium* spp. 的碳代谢特性。研究表明, *Achromatium* spp. 具有多种营养类型, 如, 化能无机自养型、混合营养和化能有机异养型。

#### 2.6 海洋中微生物

Ouverney 等人<sup>[28]</sup>采用 MAR-FISH 技术研究了海洋中的浮游生物。研究表明, 90%的  $\alpha$ -*proteobacteria* 和 *Cytophaga-Flavobacterium* 菌群可以吸收氨基酸。

Cottrell 等人<sup>[31]</sup>, 采用 MAR-FISH 技术研究了北美海岸和河口水体中不同原核生物对海洋溶解性有机物(DOM)降解量的相对贡献率。研究表明, 并不是某单个菌群对 DOM 起降解作用, 而是由多种菌群共同作用, 降解海洋中的 DOM。NAG 主要是被  $\alpha$  变形菌和 *Cytophaga-Flavobacterium* 利用。

Vila 等<sup>[32]</sup>采用 MAR-FISH 技术研究了墨西哥湾和地中海西北海岸的硫循环微生物, 结果表明 *Roseobacter* 进化枝( $\alpha$ -*proteobacteria*)占到能吸收 [ $^{35}\text{S}$ ] $\beta$ -二甲基巯基丙酸内盐(DMSP)的微生物的 13%~43%。 $\gamma$ -*proteobacteria* 和 *Cytophaga-Flavobacterium* 也能从 DMSP 中吸收硫。*Roseobacter* 和  $\gamma$ -*proteobacteria* 在所有能从 DMSP 吸收硫的 DAPI 阳性细胞中占的比例最大(50%)。他们的研究表明, 从 DMSP 中利用硫是海洋活性细菌的一个普遍特性。这些研究指出, DMSP 是许多海洋浮游细菌的一种重要底物。

Ariesyady 等<sup>[26]</sup>采用 MAR-FISH 研究了一个生产规模的厌氧污泥硝化反应器中的微生物群落结构和代谢模式。结构表明能够利用葡萄糖进行代谢的微生物有较高的丰度和多样性。 $\beta$ -*proteobacteria*、*Chloroflexi*、*Smithella*、*Syntrophomonas* 和 *Methanosaeta* 菌是利用葡萄糖、丙酸盐和丁酸盐醋酸盐的主要菌群。占总菌 1%的 *Spirochaeta* 可以利用葡萄糖, TM7 和 *Synergistes* 可以利用醋酸盐。

#### 2.7 其他

Ariesyady 等人<sup>[25]</sup>采用 MAR-FISH 技术研究了厌氧消化污泥系统中, 丙酸盐氧化菌的系统发育和功能多样性。研究表明反应器中至少存在 4 类种群: *Syntrophobacter*, *Smithella* sp. SR, *Smithella* sp. LR, 和一类没有鉴定的种群。它们的活性和丙酸盐的浓度有关。这些种属和功能多样的丙酸盐氧化菌(POB), 能够有效的适应丙酸盐浓度的改变。

### 3 结语

近年来, 现代分子生物学技术的应用, 揭示了

环境中微生物群落结构的大量信息。但是这些方法并不能提供微生物的原位生理学信息,无法将微生物的群落结构和其功能联系起来。MAR-FISH 技术能够同时在单细胞水平上,检测复杂环境中微生物的系统发育信息及其生理特性,能够实现微生物群落结构和功能的联系。MAR-FISH 可以从以下两方面提供有价值的信息:(1)定性方面:利用针对寡核苷酸的探针,直接对环境样品中的微生物进行原位生理特性研究,可以比较同一类细菌对不同放射性标记底物的吸收率,也可以研究不同种类细菌对同一种放射性标记底物的吸收率;(2)定量方面:通过 MAR-FISH 技术可以对样品上的银粒进行计数,从而得出具有不同功能特性微生物的数量,但定量的准确性和可重复性需要多次实验进行摸索。由于 FISH/MAR 技术存在很多优点,其应用范围将进一步扩展,如土壤微生物和水体底泥等。此外,将 MAR-FISH 技术同其它分子生物学方法或传统的生物学方法相结合,能够克服 MAR-FISH 的一些不足,更加清晰地认识复杂环境中微生物的原位生理学信息。

## 参 考 文 献

- [1] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, **59**(1): 143-169.
- [2] Chua ASM, Onuki M, Satoh H, *et al.* Examining substrate uptake patterns of Rhodocyclus-related PAO in full-scale EBPR plants by using the MAR-FISH technique. *Water Science and Technology*, 2006, **54**(1): 63-70.
- [3] Nielsen PH, Andreasen K, Wagner M, *et al.* Variability of type 021N in activated sludge as determined by in situ substrate uptake pattern and in situ hybridization with fluorescent rRNA targeted probes. *Water Science and Technology*, 1998, **37**(4-5): 423-440.
- [4] Lee N, Nielsen PH, Andreasen KH, *et al.* Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(3): 1289-1297.
- [5] Okabe S, Kandaichi T, ITO Tsukasa. MAR-FISH-An eco-physiological approach to link phylogenetic affiliation and in situ metabolic activity of microorganisms at a single-cell resolution. *Microbes Environ*, 2004, **19**(2): 83-98.
- [6] Andreasen K, Nielsen PH. Application of microautoradiography to the study of substrate uptake by filamentous microorganisms in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(9): 3662-3668.
- [7] Ito T, Nielsen JL, Okabe S, *et al.* Phylogenetic identification and substrate uptake patterns of sulfate-reducing bacteria inhabiting an oxic-anoxic sewer biofilm determined by combining microautoradiography and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(1): 356-364.
- [8] Sohn SH, Cho EJ, Son WJ, *et al.* Diagnosis of bovine freemartinism by fluorescence in situ hybridization on interphase nuclei using a bovine Y chromosome-specific DNA probe. *Theriogenology*, 2007, **68**(7): 1003-1011.
- [9] Andreasen K, Nielsen PH. In situ characterization of substrate uptake by *Microthrix parvicella* using microautoradiography. *Water Science and Technology*, 1998, **37**(4-5): 19-26.
- [10] Andreasen K, Nielsen PH. Growth of *Microthrix parvicella* in nutrient removal activated sludge plants: Studies of in situ physiology. *Water Research*, 2000, **34**(5): 1559-1569.
- [11] Nielsen PH, de Muro MA, Nielsen JL. Studies on the in situ physiology of *Thiothrix* spp. present in activated sludge. *Environmental Microbiology*, 2000, **2**(4): 389-398.
- [12] Nielsen PH, Roslev P, Dueholm TE, *et al.* *Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic-aerobic activated sludge plants. *Water Science and Technology*, 2002, **46**(1-2): 73-80.
- [13] Thomsen TR, Kjellerup BV, Nielsen JL, *et al.* In situ studies of the phylogeny and physiology of filamentous bacteria with attached growth. *Environmental Microbiology*, 2002, **4**(7): 383-391.
- [14] Nielsen JL, de Muro MA, Nielsen PH. Evaluation of the redox dye 5-cyano-2,3-tolyl-tetrazolium chloride for activity studies by simultaneous use of microautoradiography and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(1): 641-643.
- [15] Nielsen JL, Christensen D, Kloppenborg M, *et al.* Quantification of cell-specific substrate uptake by probe-defined bacteria under in situ conditions by microautoradiography and fluorescence in situ hybridization. *Environmental Microbiology*, 2003, **5**(3): 202-211.
- [16] Daims H, Nielsen JL, Nielsen PH, *et al.* In situ characterization of Nitrospira-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(11): 5273-5284.
- [17] Lee N, Jansen JL, Aspegren H, *et al.* Population dynamics in wastewater treatment plants with enhanced biological phosphorus removal operated with and without nitrogen removal. *Water Science and Technology*, 2002, **46**(1-2): 163-170.
- [18] Nielsen JL, Juretschko S, Wagner M, *et al.* Abundance and phylogenetic affiliation of iron reducers in activated sludge as assessed by fluorescence in situ hybridization and microautoradiography. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(9): 4629-4636.

- [19] Ito T, Nielsen JL, Okabe S, *et al.* Phylogenetic identification and substrate uptake patterns of sulfate-reducing bacteria inhabiting an oxic-anoxic sewer biofilm determined by combining microautoradiography and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(1): 356–364.
- [20] Kong YH, Beer M, Rees GN, *et al.* Functional analysis of microbial communities in aerobic-anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (P/C) ratios. *Microbiology-SGM*, 2002, **148**: 2299–2307.
- [21] Nielsen JL, Nielsen PH. Enumeration of acetate-consuming bacteria by microautoradiography under oxygen and nitrate respiring conditions in activated sludge. *Water Research*, 2002, **36**(2): 421–428.
- [22] Kindaichi T, Ito T, Okabe S. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(3): 1641–1650.
- [23] Okabe S, Kindaichi T, Nakamura Y, *et al.* Eco-physiology of autotrophic nitrifying biofilms. *Water Science and Technology*, 2005, **52**(7): 225–232.
- [24] Labbe N, Laurin V, Juteau P, *et al.* Microbiological community structure of the biofilm of a methanol-fed, marine denitrification system, and identification of the methanol-utilizing microorganisms. *Microbial Ecology*, 2007, **53**(4): 621–630.
- [25] Ariesyady HD, Ito T, Yoshiguchi K, *et al.* Phylogenetic and functional diversity of propionate-oxidizing bacteria in an anaerobic digester sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **75**(3): 673–683.
- [26] Ariesyady HD, Ito T, Okabe S. Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Research*, 2007, **41**(7): 1554–1568.
- [27] Ginige MP, Hugenholtz P, Daims H, *et al.* Use of stable-isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescence in situ hybridization-microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(1): 588–596.
- [28] Ito T, Okabe S, Satoh H, *et al.* Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activities in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(3): 1392–1402.
- [29] Ouverney CC, Fuhrman JA. Combined Microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in situ. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(7): 3264–3264.
- [30] Gray ND, Howarth R, Pickup RW, *et al.* Use of combined microautoradiography and fluorescence in situ hybridization to determine carbon metabolism in mixed natural communities of uncultured bacteria from the genus *achromatium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(10): 4518–4522.
- [31] Cottrell MT, Kirchman DL. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low-and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(4): 1692–1697.
- [32] Vila M, Simo R, Kiene RP, *et al.* Use of microautoradiography combined with fluorescence in situ hybridization to determine dimethylsulfoniopropionate incorporation by marine bacterioplankton taxa. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(8): 4648–4657.
- [33] Yang YR, Zarda A, Zeyer J. Combination of microautoradiography and fluorescence in situ hybridization for identification of microorganisms degrading xenobiotic contaminants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, **22**(12): 2840–2844.

## 新辟栏目介绍

### 生物实验室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度，深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果，交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室，以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。