

荧光原位杂交在喀斯特山地土壤硫酸盐还原菌检测中的应用

张 伟^{1,2} 刘丛强^{1*} 刘涛泽^{1,2} 陆 婷^{1,2} 张丽丽³

(1. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室 贵阳 550002)

(2. 中国科学院研究生院 北京 100039)

(3. 贵州师范大学理学院 贵阳 550001)

摘 要: 采用荧光原位杂交(Florescence *in situ* Hybridization, FISH) 技术分析了喀斯特山地土壤硫酸盐还原菌(SRB)的数量和空间分布状况。运用 16S rRNA 特异性探针, 结合DAPI全细胞染色和样品稀释, FISH 技术准确、高效地原位检测出土壤剖面中SRB的数量和分布状况。结果显示, 在所研究的土壤剖面各层均有SRB检出, 最低为 $(0.8\pm 0.4)\times 10^7$ 个/g, 最高为 $(6.2\pm 1.3)\times 10^7$ 个/g, 平均为 $(2.7\pm 1.2)\times 10^7$ 个/g。FISH 能同时对土壤中的SRB进行定性和定量分析, 是研究环境中SRB时空分布的快速有效的检测技术。

关键词: 荧光原位杂交, 土壤, 硫酸盐还原菌

Application of Florescence *in situ* Hybridization to Detecting Karst Mountainous Soil Sulfate-reducing Bacterium

ZHANG Wei^{1,2} LIU Cong-Qiang^{1*} LIU Tao-Ze^{1,2} LU Ting^{1,2} ZHANG Li-Li³

(1. The State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institution of Geochemistry, Chinese Academy of Science, Guiyang 550002)

(2. The Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100039)

(3. Guizhou Normal University Science School, Guiyang 550001)

Abstract: Florescence *in situ* Hybridization(FISH) was used to analyze the amount and spatial distribution of Karst mountainous soil sulfate-reducing bacterium(SRB), 16S rRNA specific probe used with DAPI total cell staining and dilute technology, FISH can in situ detect the amount and spatial distribution of SRB in soil profile efficiently. The results showed that, there were sulfate-reducing bacteria in each layer of soil profile. The minimum cell numbers was $(0.8\pm 0.4)\times 10^7$ cells/g and maximum cell numbers was $(6.2\pm 1.3)\times 10^7$ cells/g, the average was $(2.7\pm 1.2)\times 10^7$ cells/g. FISH is a rapid and effective detection technology in the research of spatial and temporal distribution of SRB in environment that can qualitative and quantitative analysis SRB in the soil simultaneously.

Keywords: Florescence *in situ* hybridization, Soil, Sulfate-reducing bacterium

硫酸盐还原菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB)是一大类厌氧菌,广泛分布在水体、土壤和沉积物等环境中,其特点是在代谢活动中可以利用硫酸盐、亚硫酸盐、硫代硫酸盐或元素硫作为最终电子受体而形成高浓度的 H_2S ,SRB在硫元素的生物地球化学循环、有机质降解以及部分重金属的迁移转化中起着重要作用^[1-5]。传统方法分离和鉴定SRB一般需要实验室纯培养,厌氧条件难于控制,费时费力且细菌计数不准确,误差较大。随着分子生物学技术的飞速发展,分子生物学方法已经渗透到环境生物地球化学的许多领域。荧光原位杂交(Florescence In Situ Hybridization, FISH)是把非放射性的荧光信号基团标记在特异性碱基序列的核酸探针上,再用带有荧光标记的探针与固定在玻片或滤膜上细胞中特定的核苷酸序列进行杂交,然后在荧光显微镜下对荧光信号进行辨别和摄像。FISH技术无需纯培养和分离DNA或RNA,结果能更确切地反映环境中微生物的原位状况。

国内外学者应用FISH技术研究水体、沉积物、活性污泥及生物膜中SRB分布的报道较多^[6-15],而关于土壤的报道较少^[16-18]。本文应用针对SRB 16S rRNA特异性序列设计的寡核苷酸探针,结合DAPI全细胞染色和稀释技术,分析了喀斯特山地土壤中SRB的原位分布状况,进而加深对喀斯特地区土壤硫的生物地球化学循环和有机质厌氧降解等重要生物地球化学过程的认识。

1 材料和方法

1.1 样品采集及处理

于2007年5月在贵州普定县喀斯特岩溶站(N26° 16.090', E105° 46.592')崖口山和对面山峰沿垂直高度各采集3个山地土壤剖面,在广西环江县喀斯特农业生态国家野外观测研究站(N24° 44.534', E108° 19.456')后山选择采集6个山地土壤剖面,以10 cm间隔取样,每个剖面采集5个样品,共60个样品。广西环江采样点和贵州普定崖口山土壤剖面上覆植被为灌丛,崖口山对面山峰上覆植被为森林。采样次序自下而上以减少样品间交叉污染。所有采样工具均经高压灭菌处理,现场工具用75%酒精擦拭,样品采集后立刻装入便携式冰箱保存至实验室分析。微生物计数要求样品无污染,及时处理,

本研究采样点距实验室仅3 h左右车程,可满足计数要求。

1.2 主要试剂及仪器

多聚赖氨酸(分子量大于15000 D, Sigma), PBS, Tris Buffer, APES, 甲酰胺, DAPI 染色液(Roche), 焦碳酸二乙酯(DEPC)。主要仪器包括:pH计, 载波片, FISH专用试盒, SWCJCO 净化工作台, Allerga 64R 高速冷冻离心机(Beckman), Nikon Eclipse 80i 落射荧光显微镜, 配备100 W高压汞灯, ALP全自动高压灭菌器。

1.3 荧光探针

所用探针为SRB385(上海生工合成), 5'端 Cy3 标记, 序列为: 5'-CGGCGTCTGCTGCGTCAGG-3' 包含 δ 群 Proteobacteria 的硫酸盐还原菌。

1.4 FISH 分析喀斯特山地土壤 SRB

1.4.1 玻片处理:原位杂交,常在载玻片上进行,故载玻片的处理至关重要,必须清洁且不能有任何核酸的污染。处理方法如下:(1)玻片的洗涤:热肥皂水浸泡过夜,次日自来水冲洗干净。① 1 mol/L HCl浸泡1 h左右, DEPC水中洗片, 95%乙醇中洗片, 空气干燥,重复一遍步骤~。(2)玻片的硅化:室温下将玻片放入2%的APES/丙酮(V/V)溶液中浸泡10 s, DEPC水中洗片, 95%乙醇中洗片, 空气干燥。(3)玻片的包被:吸取20 μ L多聚赖氨酸工作液涂满玻片上1 cm²的小方格(事先划好), 空气干燥。包被过的玻片应尽早使用,以防多聚赖氨酸解聚失效。

1.4.2 样品预处理与固定:取0.5 g土壤样品于10 mL离心管中,加入5 mL 4%多聚甲醛/PBS [0.13 mol/L NaCl, 7 mmol/L Na₂HPO₄, 3 mmol/L NaH₂PO₄ (pH 7.2)], 4 \times , 固定16 h左右。次日多聚甲醛固定的样品随后加入适量PBS(pH 7.2), 无菌研磨, 涡旋振荡混匀, 12000 r/min离心10 min, 弃上清液, 重复2次。样品最终浓度为100 mg/mL。取50 μ L土壤分散液样品(含5 mg土壤)溶于950 μ L 0.1% 焦磷酸钠中振荡混匀, 制成杂交用土壤分散液^[17]。

1.4.3 原位杂交反应:10 μ L固定并分散的土壤溶液转移到多聚赖氨酸包被的载玻片上(1 cm²), 室温干燥至少3 h, 然后50%、80%和96%乙醇分别脱水3 min, 空气干燥。1 mL 10 mg/mL溶菌酶(100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 5 mmol/L EDTA) 37 $^{\circ}$ C 孵育30 min。灭菌水洗涤1次, 再用50%、

80%和 96%乙醇分别脱水 3 min, 空气干燥。9 μL 杂交缓冲液(0.9 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2), 5 mmol/L EDTA, 0.01% SDS, 20%甲酰胺), 25 ng/ μL 探针 1 μL , 200 ng/ μL DAPI 1 μL , 42 湿盒中暗处杂交 2 h。杂交后, 载玻片用缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2), 10 mmol/L EDTA, 0.01% SDS, 308 mmol/L NaCl) 48 $^{\circ}\text{C}$, 30 min洗去未杂交的探针, 最后灭菌去离子水冲洗干净, 空气干燥^[17–20]。

1.4.4 镜检及计数: 高倍镜下(1000 倍), 选择 WG 滤光片, 计数发红色荧光的菌体为 SRB。选择 WU 滤光片, 计数发蓝色荧光的菌体即为总细胞数。采用 Nikon NIS Elements AR 荧光成像分析软件进行

拍照和计数, 随机选择 90 个 0.01 mm²小视野, 由软件给出 90 个小视野的数量平均值 \bar{x} 和标准偏差 s , 然后计算出 1 cm²内SRB的总数, 最后得到 1 g干土中含有的SRB个数, 计数结果表示为 $\bar{x}\pm s$ 。

1.4.5 对照: 用选择性培养基富集土壤样品中的 SRB, 取富集的菌液作为阳性对照, 杂交缓冲液只加入探针作为阴性对照。

2 结果与讨论

2.1 土壤剖面 SRB 的荧光原位杂交结果

在所分析的 60 个样品中均有 SRB 阳性检出, 荧光信号对比明显, 见图 1。土壤剖面 SRB 含量见表 1。

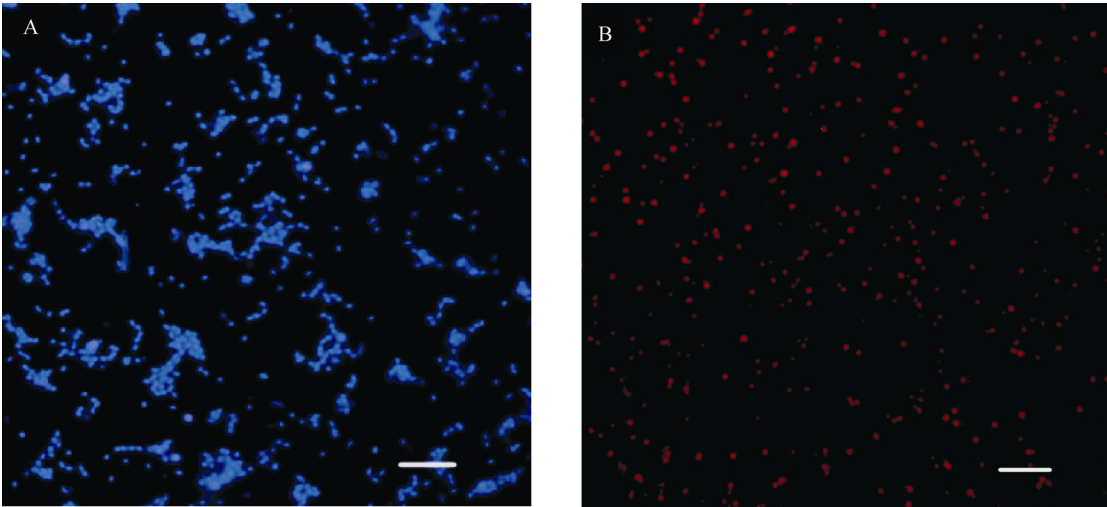


图 1 同一视野下 DAPI 全细胞染色(A)和 SRB385 探针染色(B)(直线代表 5 μm)
Fig. 1 DAPI total cell staining (A) and SRB385 probe staining (B) in the same field (bar=5 μm)

| 表 1 喀斯特山地土壤剖面SRB含量($\times 10^7$ 个/g, n=90, $\bar{x}\pm s$) | | | | | | | |
|--|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Table 1 The amount of SRB in Karst mountainous soil profile($\times 10^7$ 个/g, n=90, $\bar{x}\pm s$) | | | | | | | |
| | 垂直深度 Vertical depth | 剖面 1 Profile 1 | 剖面 2 Profile 2 | 剖面 3 Profile 3 | 剖面 4 Profile 4 | 剖面 5 Profile 5 | 剖面 6 Profile 6 |
| 普定采样点 Puding sampling site | 0 cm~10 cm | 3.5 \pm 1.6 | 4.1 \pm 1.2 | 1.8 \pm 1.1 | 2.3 \pm 1.2 | 1.9 \pm 0.6 | 1.9 \pm 1.2 |
| | 10 cm~20 cm | 5.2 \pm 1.1 | 6.2 \pm 1.3 | 2.2 \pm 1.3 | 3.3 \pm 1.6 | 2.8 \pm 1.1 | 2.2 \pm 1.3 |
| | 20 cm~30 cm | 5.8 \pm 0.9 | 4.5 \pm 0.9 | 2.9 \pm 1.5 | 2.2 \pm 0.8 | 3.5 \pm 1.3 | 4.1 \pm 1.9 |
| | 30 cm~40 cm | 4.7 \pm 1.5 | 3.3 \pm 1.6 | 3.8 \pm 1.6 | 3.5 \pm 1.6 | 2.4 \pm 1.1 | 2.7 \pm 1.6 |
| | 40 cm~50 cm | 2.9 \pm 0.9 | 1.8 \pm 0.7 | 1.4 \pm 0.7 | 1.9 \pm 0.9 | 1.8 \pm 0.8 | 1.6 \pm 0.7 |
| | 垂直深度 Vertical depth | 剖面 7 Profile7 | 剖面 8 Profile8 | 剖面 9 Profile9 | 剖面 10 Profile10 | 剖面 11 Profile11 | 剖面 12 Profile12 |
| 环江采样点 Huanjiang sampling site | 0 cm~10 cm | 2.3 \pm 1.2 | 2.7 \pm 1.3 | 0.9 \pm 0.4 | 1.1 \pm 0.8 | 0.8 \pm 0.4 | 1.2 \pm 0.6 |
| | 10 cm~20 cm | 3.2 \pm 1.1 | 5.2 \pm 1.9 | 2.2 \pm 1.1 | 1.9 \pm 1.2 | 2.1 \pm 1.1 | 2.6 \pm 1.5 |
| | 20 cm~30 cm | 4.1 \pm 1.9 | 3.5 \pm 1.9 | 3.1 \pm 1.7 | 2.5 \pm 0.9 | 3.5 \pm 1.8 | 4.5 \pm 1.8 |
| | 30 cm~40 cm | 3.1 \pm 1.6 | 2.3 \pm 1.1 | 2.1 \pm 1.6 | 3.1 \pm 1.3 | 3.1 \pm 1.1 | 3.3 \pm 1.2 |
| | 40 cm~50 cm | 1.2 \pm 0.7 | 0.9 \pm 0.7 | 1.9 \pm 0.7 | 1.7 \pm 0.7 | 1.9 \pm 1.2 | 1.6 \pm 0.9 |

由表 1 可以看出,喀斯特山地土壤剖面中的 SRB 具有相似的数量分布:土壤剖面表层 10 cm 内 SRB 数量较少,沿剖面向下,SRB 数量逐渐增加,至次底层和底层又减少。分析可能与土壤剖面各层的厌氧条件、有机质含量和 SO_4^{2-} 浓度有关,表层土有机质含量虽高,但厌氧条件不充分,不适宜 SRB 生长,而在次表层及中间层, SO_4^{2-} 和有机质可随雨水迁移并积累且厌氧条件优于表层土,SRB 数量有所增加,喀斯特山地土层浅薄,至次底层和底层时已接近成土基岩,虽具备厌氧条件,但 SO_4^{2-} 和有机质已耗用将尽,故 SRB 数量急剧减少。

普定采样点灌丛植被下的土壤剖面 SRB 数量平均值为 $(3.6 \pm 1.2) \times 10^7$ 个/g, 高于森林植被 $(2.5 \pm 1.1) \times 10^7$ 个/g。也高于环江采样点的平均值 $(2.4 \pm 1.2) \times 10^7$ 个/g。

2.2 FISH 检测结果假阳性和假阴性的排除

寡核苷酸探针的特异性决定了 FISH 检测结果的精准性,本实验中使用的 SRB385 探针为众多研究人员所用^[2,3,6,10,11,19,20],是检测 SRB 的通用探针。此外,一些土壤矿物颗粒具有自发荧光,会对 FISH 检测产生假阳性,运用 DAPI 进行全细胞染色,可以在同一视野下观察计数总细胞数和 SRB,能有效的排除 FISH 检测的假阳性,减少计数误差。FISH 检测的假阴性主要与细菌体内 rRNA 丰度有关,而 rRNA 丰度又取决于细菌自身的生长状况,一般来说,细菌体内含有较高的 rRNA 丰度,但采样后细菌所处的环境状况有所改变,如不及时固定,细菌生长减缓甚至进入休眠状态,导致 rRNA 含量降低和细胞渗透性较差,这些都将导致假阴性结果^[15,19,21,22]。因此,对细菌细胞及时固定,优化探针渗透性是减少实验结果假阴性的关键。本实验从采样到实验室固定不到 5 h,溶菌酶处理可以增加细胞的渗透性,以及高亮度和高稳定性的荧光染料 Cy3 的使用均可以有效防止假阴性的发生。

3 结语

硫酸盐还原菌(SRB)是一类分布广泛且具有重要生态学意义的微生物。传统的环境样品 SRB 分离和鉴定技术只能分析微生物群落的一小部分^[14,16-18,23],且误差较大。FISH 技术结合了分子生物学的精准性和显微镜的可视性,可以在细胞水平

上对喀斯特山地土壤 SRB 进行定性定量分析和空间位置标示,而且无需纯培养和核酸提取步骤,得到的结果相比传统方法可以确切地反映 SRB 的原位分布状况,是研究 SRB 等难培养微生物快速有效的检测技术。

致谢:感谢贵阳医学院现代病原生物学基础实验室在实验仪器使用方面提供的支持和帮助。

参考文献

- [1] Castro HF, Williams NH, Ogram A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, **31**: 1-9.
- [2] Bo Barker Jørgensen, Friedhelm Bak. Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, **57**(3): 847-856.
- [3] Bulent Içgen, Sue Harrison. Exposure to sulfide causes populations shifts in sulfate-reducing consortia. *Research in Microbiology*, 2006, **157**: 784-791.
- [4] Devereux R, Hines ME, Stahl DA. S cycling: characterization of natural communities of sulfate-reducing bacteria by 16S rRNA sequence comparisons. *Microbiology Ecology*, 1996, **32**(3): 283-292.
- [5] Ganesh R, Robinson KG, Chu LL, et al. Reductive precipitation of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*: evaluation of cocontaminant effects and selective removal. *Water Research*, 1999, **33**: 3447-3458.
- [6] 王明义, 梁小兵, Tae Seok Ahn, et al. 阿哈湖深层水中微生物和硫酸盐还原菌数量及群落结构空间变化. 生态学杂志, 2007, **26**(11): 1-4.
- [7] Karen Bade, Werner Manz, Ulrich Szewzyk. Behavior of sulfate reducing bacteria under oligotrophic conditions and oxygen stress in particle-free systems related to drinking water. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, **32**, 215-223.
- [8] Detmers J, Strauss H, Schulte U, et al. FISH Shows That *Desulfotomaculum* spp. are the dominating sulfate-reducing bacteria in a pristine aquifer. *Microbiology Ecology*, 2004, **47**: 236-242.
- [9] Kousuke Ishii, Marc Mußmann, Barbara J, et al. An improved fluorescence *in situ* hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, **50**: 203-212.
- [10] Enric Llobet-Brossa, Ramon Rosselló-Mora, Rudolf Amann. Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998,

- 64(7): 2691–2696.
- [11] Werner Manz, Michael Eisenbrecher, Thomas R Neu, *et al.* Abundance and spatial organization of gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with species 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **25**: 43–61.
- [12] Yuko Saiki, Chikako Iwabuchi, Akiko Katami, *et al.* Microbial analyses by fluorescence *in situ* hybridization of well-settled granular sludge in Brewery wastewater treatment plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, **93**(6): 601–606.
- [13] Niels Birger Ramsing, Michael KÜhl, Bo Barker Jørgensen. Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(11): 3840–3849.
- [14] Claudia FrÜnd, Yehund Cohen. Diurnal cycles of sulfate reduction under oxic conditions in cyanobacterial mats. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**(1): 70–77.
- [15] Amann RI, Stromley J, Devereux R, *et al.* Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**(2): 614–623.
- [16] Thilo Eickhorst, Rolf Tippkötter. Detection of microorganisms in undisturbed soil by combining fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and micropedological methods. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, in Press.
- [17] Boris Zarda, Dittmar Hahn, Antonis Chatzinotas, *et al.* Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridization. *Archives of Microbiology*, 1997, **168**: 185–192.
- [18] Suresh Kumar Dubey, Anil Kumar Tripathi, Siddh Nath Upadhyay. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. *Bioresource Technology*, 2006, **97**: 2217–2224.
- [19] Içgen B, Moosa S, Harrison STL. A study of the relative dominance of selected anaerobic sulfate-reducing bacteria in a continuous bioreactor by fluorescence *in situ* hybridization. *Microbial Ecology*, 2007, **53**: 43–52.
- [20] Ralf Rabus, Manabu Fukui, Heinz Wilkes, *et al.* Degradative Capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(10): 3605–3613.
- [21] Albin Alereider, Jakob Pernthaler, Rudolf Amann, *et al.* Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(6): 2138–2144.
- [22] Svend Jørgen Binnerup, Jaap Bloem, Bjarne Munk Hansen, *et al.* Ribosomal RNA content in microcolony forming soil bacteria measured by quantitative 16S rRNA hybridization and image analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **37**: 231–237.
- [23] Matthew T Cottrell, David L Kirchman. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(12): 5116–5122.

新辟栏目介绍

显微世界

“显微世界”栏目将刊出一些精美清晰的显微照片,带您走进显微镜下的微生物世界,希望在阅读期刊相关科学新进展的同时,给您带来一种愉悦的科学艺术视觉享受。同时欢迎广大作者、读者朋友积极为我们推荐或提供高质量、高清晰的显微照片(提供者保证该图片无任何知识产权问题)。