

厌氧生境体系中产氢产乙酸细菌的 FISH 定量解析

李艳娜¹, 许科伟¹, 堵国成^{1,2}, 陈 坚^{1,2}, 刘 和^{1*}

(江南大学生物工程学院¹ 环境生物技术研究室² 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122)

摘 要 产氢产乙酸细菌是一类在有机物厌氧降解过程中起重要作用的细菌。以基于 16S rRNA 序列设计的特异性寡核苷酸探针为基础, 优化 FISH 实验条件, 确定该技术检测产氢产乙酸细菌的实验条件为样品固定 19h、乙醇脱水 5min、杂交缓冲液中甲酰胺浓度 55%。运用建立的 FISH 技术检测了几种厌氧消化体系中产氢产乙酸细菌的数量, 并与用传统 MPN 方法的结果进行了比较。结果表明, 产氢产乙酸细菌分布广泛, 废水处理 UASB 反应器和动物消化道, 特别是反刍动物瘤胃中的产氢产乙酸细菌数量较高, 其丰度分别为 1.70×10^9 cells/mL 样品、 6.50×10^8 cells/mL 样品。湖底沉积物中产氢产乙酸细菌数量较少, 仅占整个微生物群落的 0.4%, 含量为 1.20×10^8 cells/mL 样品。

关键词 产氢产乙酸细菌 荧光原位杂交 寡核苷酸探针 厌氧体系

中图分类号: Q938, Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)06-1038-06

产氢产乙酸细菌在厌氧消化过程中占有重要位置, 使水解发酵细菌水解糖、蛋白质和脂类所产生的代谢中间产物, 如丙酸、丁酸等, 转化为产 CH_4 的前体——乙酸、甲酸、 H_2 和 CO_2 等。认识和了解产氢产乙酸细菌的形态、组成、分布和丰度等特性对于研究有机物的生物降解和生物转化过程中的微生物学机理等十分重要。

Bryant 等人于 1967 年发现并分离纯化出了最早的产氢产乙酸菌株^[1], 此后, 国内外对产氢产乙酸细菌的研究一直不断^[2~4]。但是至今, 产氢产乙酸细菌的研究仍主要停留在传统分离培养方面, 特别是计数方面, 主要依赖以纯培养技术为基础的最大或然数方法 (Most Probable Number, MPN)^[5~7]。产氢产乙酸细菌是一类严格厌氧的真细菌, 生长周期长, 而且大部分产氢产乙酸细菌都是互营细菌, 即其生长和代谢完全依赖于产甲烷细菌等其他微生物将代谢产物如 H_2 的转移和去除。因此, 对产氢产乙酸细菌进行分离培养的研究时, 要求极高的操作条件, 耗时费力。随着现代分子生物技术的发展, 不依靠纯培养的微生物群落结构的分析方法已得到广泛发展和应用, 如荧光原位杂交技术 (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH), 这些方法能够更加精确地揭示微生物种类和遗传的多样性等各方面的性质。目前, 通过分子生物技术对产氢产乙酸细菌的研究极少, 只有国外一些研究借助了膜杂交等分子生物学

方法对其进行过简单的调查分析, 国内几乎还没有这方面的研究^[8~10]。

本文以厌氧消化体系中产氢产乙酸细菌为研究对象, 避免传统分离培养技术, 应用现代分子生物学技术, 建立并优化了检测产氢产乙酸细菌的荧光原位杂交技术, 对几种不同生境中的产氢产乙酸细菌进行定量监测, 其结果为了了解产氢产乙酸细菌在某些厌氧生境中的分布和功能具有实际指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 在无锡地区 6 个地点进行了采集取样, 包括 (1) 无锡某公司 UASB 反应器中污泥 (2) 太湖底泥 (3) 城市下水道污泥 (4) 无锡 DSM 柠檬酸厂 IC 反应器污泥 (5) 无锡奶牛场牛粪 (6) 无锡城北污水处理厂消化污泥。采集的环境样品立即进行预处理。

1.1.2 主要试剂和仪器 食丁酸盐产氢产乙酸细菌探针 (S-F-Synn-0700-a-R-23) 和食丙酸盐产氢产乙酸细菌探针 (S-S-S. wol-0223-a-R-19、S-S-MPOB-0222-a-R-19), 其修饰合成均由上海生物工程有限公司完成, 荧光染料 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 购自上海捷瑞科技有限公司。荧光显微镜 (DXM1200C) 为 Nikon 公司产品。

1.2 样品预处理

一定体积的环境样品用磷酸缓冲液 1 × PBS 清

基金项目: 国家自然科学基金 (50508014), 国家“863 计划” (2006AA06Z315)

* 通讯作者。Tel 86-510-85918310, Fax 86-510-85918309; E-mail: liuhe@jiangnan.edu.cn

作者简介: 李艳娜 (1983 -), 女, 河南濮阳人, 硕士研究生, 主要从事废物资源化和环境微生物研究。E-mail: liyanna-163@163.com

收稿日期: 2007-07-03, 接受日期: 2007-08-03, 修回日期: 2007-09-07

洗 2 ~ 3 次后 ,与 3 倍体积的固定剂 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde ,PFA)充分混合 ,固定剂可以保护细胞的完整性 ,同时使探针容易渗透进入细胞 ,与靶 DNA 序列结合。将加入 4% PFA 的样品置于 4℃ ,1 ~ 24h 后 ,离心弃去固定剂 ,然后用 1 × PBS 清洗样品 ,并将样品重新悬浮于等体积的 1 × PBS 溶液中 ,最后用乙醇溶液 , - 20℃ 保存。

1.3 载玻片的准备

取 5μL 适当浓度稀释的固定化细胞 ,均匀涂布于 2 孔白明胶包埋后的载玻片的每个孔上 ,在室温下将载玻片晾干 ,再将载玻片置于 46℃ 中热固定 20min ,热固定时间太长易引起细胞形态变化。将细胞依次在 50%、80% 和 100% 的乙醇溶液中脱水各 5 ~ 15min ,自然干燥。

1.4 探针的选用

产氢产乙酸细菌系统发育呈多样性趋势 ,分支

众多 ,至今描述的就 有 12 个属的 19 个种 (亚种) ,很难用一种通用探针检测到所有的目标细胞。食丁酸盐产氢产乙酸细菌和食丙酸盐产氢产乙酸细菌是产氢产乙酸细菌的常见细菌 ,针对这两类细菌 ,采用了 3 种不同种属水平的寡核苷酸探针 ,包括 S-F-Symm-0700-a-R-23^[8] 和 S-S-S. wol-0223-a-R-19、S-S-MPOB-0222-a-R-19^[9,10]。探针 S-F-Symm-0700-a-R-23 几乎可以和所有食丁酸盐产氢产乙酸细菌靶序列结合 ,属于属水平检测探针 ;探针 S-S-S. wol-0223-a-R-19 和探针 S-S-MPOB-0222-a-R-19 用于检测食丙酸盐产氢产乙酸细菌 ,属于种水平的检测探针。食丁酸盐产氢产乙酸细菌探针用荧光染料花青素 Cy3 在 3' 端标记 ,2 种食丙酸盐产氢产乙酸细菌探针都用荧光染料异硫氰酸荧光素 FITC 在 3' 端标记。探针详细情况见表 1。

表 1 产氢产乙酸细菌探针

Table 1 Oligonucleotide probes of syntrophic acetogenic bacteria			
Probe	Target organism(s)	Sequence(5'→3')	Reference
S-F-Symm-0700-a-R-23	<i>Syntrophospora bryantii</i>	ACTGGTNTTCCTCCTGATTGTGA	8 ,
	<i>Syntrophomonas sapovorans</i>		
	<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>wolfei</i>		
	<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. LYB		
S-S-S. wol-0223-a-R-19	<i>Syntrophobacter wolinii</i>	ACGCAGACTCATCCCGTG	9 ,10
S-S-MPOB-0222-a-R-19	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	ACGCAGGCCCATCCCGAA	9 ,10
	<i>Syntrophobacter pfeneggii</i>		

1.5 总微生物检测

为确定样品中产氢产乙酸细菌在总微生物中的相对丰度 ,采用荧光染料法对总微生物数量定量。

1.6 荧光显微镜检测条件

在荧光显微镜 Nikon(DXM1200C)不同激发波长下观察 ,Cy3 呈显红色荧光 ,FITC 呈显绿色荧光 ,DAPI 呈显蓝色荧光。实验中通过不同荧光信号分辨不同靶细胞 ,3 种荧光染料的检测条件如表 2 所示。

表 2 FISH 采用的荧光染料

Table 2 Fluorescent dyes used for fluorescence in situ hybridization				
Fluorescent dye	Absorbance/ nm	Emission/ nm	Fluorescent color	Working solution/ (ng/μL)
Cy3	552	570	Red	30
FITC	495	520	Green	50
DAPI	360	460	Blue	0.5

1.7 原位杂交 ,镜检和计数

细菌丰度 =
$$\frac{\text{视野中细菌数目} \times \text{载玻片凹孔面积} \times \text{稀释倍数} \times \text{固定样品体积}}{\text{视野面积} \times \text{涂布载玻片固定样品体积} \times \text{实际样品体积}}$$

(1)

在载玻片的每个孔上加入 10μL 现配的杂交缓冲液(0.18mol/L NaCl 0.02mol/L Tris/HCl(pH8.0) ,一定浓度的甲酰胺 ,每种探针的最适甲酰胺浓度通过实验优化确定) ,再加入 1μL 产氢产乙酸细菌探针使用液 ,加盖玻片 ,在杂交管中放一张吸水纸 ,载玻片放入杂交管内 ,多余的杂交缓冲液倾于吸水纸上 ,46℃ 杂交 1.5 ~ 3h。杂交完毕 ,迅速取出载玻片 ,放入 48℃ 杂交洗脱液 15 ~ 20min(0.02 mol/L Tris/HCl (pH8.0) 0.005mol/L EDTA ,一定浓度的 NaCl(其浓度根据杂交缓冲液中甲酰胺浓度确定)) ,充分除去未杂交的探针和杂交缓冲液 ,尽量减少背景值 ,再用冰冷 ddH₂O 漂洗 2 ~ 3 次 ,自然干燥。DAPI 染色 5min ,再次自然干燥 ,盖上盖玻片 ,立刻在荧光显微镜下镜检 ,观察视野取 30 次 ,用 Image-Pro Plus 软件计数 ,样品中细菌丰度由公式 (1) 计算得出 ,最后数据用 Microsoft Office Excel 2003 进行统计分析。

1.8 FISH 实验条件优化

由于不同细菌和探针对 FISH 实验条件要求不同,故需优化 FISH 在检测产氢产乙酸细菌时的实验条件。由于文献报道 UASB 反应器中的生物多样性高,同时所测定的 3 种靶菌群都有在其中检出过^[8~10],故选用华润公司 UASB 污泥样品,分别对样品固定时间(fixation time)、脱水时间(dehydrated time)和甲酰胺浓度(formamide concentration)3 种影响杂交结果的主要因素进行优化。固定时间和脱水时间一般分别为 1~24h 和 5~15min。考虑到环境样品杂质较多,固定剂不容易作用于细胞,因此采用较长固定时间,在 17h、18h、19h、20h、21h、22h、23h、24h 8 种固定时间中选择最优实验条件。确定最佳固定时间后,再分别考察 5、10、15 min 3 种脱水时间,优化脱水时间;最后,以 5% 为梯度在 0%~65% 浓度之间优化选择每种探针杂交最适甲酰胺浓度。

1.9 样品测定

确定产氢产乙酸细菌检测条件的基础后,对采集的 6 种环境样品进行产氢产乙酸细菌的检测与比较,分析产氢产乙酸细菌的数量和相对丰度等,对其主要生境等进行探讨。相同实验条件下每份样品重复检测 3 次。实验过程设置阴性对照:样品进行杂交,杂交液中不含探针。

2 结果和讨论

2.1 FISH 检测方法的建立与条件优化

固定样品是 FISH 操作的第一个步骤。样品固定失败,探针就无法渗透进入细菌细胞,而固定结果主要取决于固定时间,因此对样品固定时间进行优化。结果表明固定时间为 19h 时,样品与 3 种探针结合都比较好,可在荧光显微镜下观察到明显的红色和绿色荧光信号。与固定时间为 19h 的样品比较,其他 7 种固定时间的样品与 3 种探针结合能力都很弱,仅见到很黯淡的荧光信号。结果选取 19h 为最佳固定时间。

脱水可以使探针更好地与细胞靶序列结合。脱水过程一般很容易被忽视,但是脱水过程的操作和脱水时间掌握不好,可能在 FISH 操作后观察不到荧光信号。优化脱水时间表明在每种乙醇溶液中脱水 5min 时荧光信号最为强烈,菌体分辨清晰,分布也较均匀。

在 FISH 操作中,杂交缓冲液中甲酰胺浓度和洗脱液中 NaCl 浓度对结果都有一定影响。杂交缓冲液中甲酰胺浓度和洗脱液 NaCl 浓度过低或过高都会降低探针的特异性。甲酰胺浓度一般处于 0~65% 之间,并以 5% 为梯度进行变化,杂交洗脱液中的 NaCl 浓度随杂交缓冲液中甲酰胺浓度的变化而变化,两者之间呈现一定的函数关系,因此在考察甲酰胺浓度的同时考察了洗脱液中 NaCl 浓度。选用不同的甲酰胺浓度时,使用食丙酸盐产氢产乙酸细菌探针(S-S-S. wol-0223-a-R-19、S-S-S. wol-0223-a-R-19)进行 FISH 操作后,发现荧光信号差别较大,在甲酰胺浓度为 55% 时 2 种食丙酸盐产氢产乙酸细菌探针杂交后荧光信号相对较强,观察到明显的绿色荧光,在其余甲酰胺浓度时荧光信号比较微弱。而应用食丁酸盐产氢产乙酸细菌探针(S-F-Symm-0700-a-R-23)进行杂交,发现在选用不同甲酰胺浓度时荧光信号都比较强,都会看到明亮的带有红色荧光的菌体,特别是选用 15%、50%、55%、60% 和 65% 浓度的甲酰胺时,观察到明显的带有红色荧光的菌体,但在 60% 和 65% 甲酰胺浓度时,荧光信号过于强烈,菌体过多,有可能是甲酰胺浓度为 60% 和 65% 时食丁酸盐产氢产乙酸细菌探针的特异性降低,与食丁酸盐产氢产乙酸细菌结合的同时也与其他非食丁酸盐产氢产乙酸细菌结合。结合食丙酸盐产氢产乙酸细菌探针和食丁酸盐产氢产乙酸细菌探针的总体情况,55% 甲酰胺浓度最为适合选用。

由此完成了 FISH 实验条件优化研究。选用最佳固定时间、脱水时间和甲酰胺浓度等因素进行实验才能得到好的杂交结果。采用优化得出的最佳固

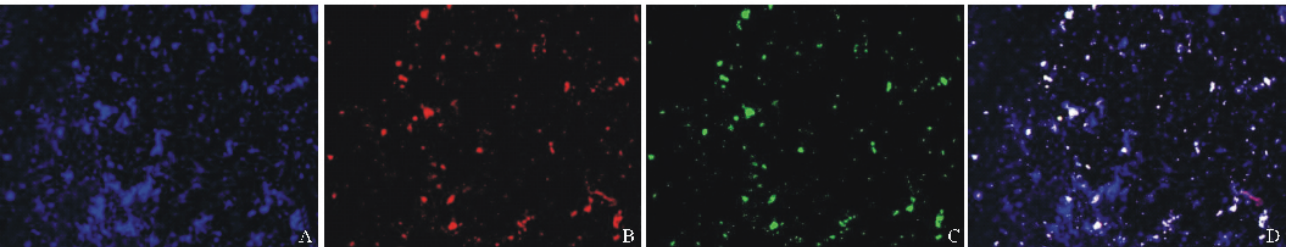


图 1 UASB 污泥样品荧光显微图像

Fig.1 Fluorescence images of UASB sludge sample. A: Total microorganisms; B: Saturated fatty acid-β-oxidizing syntrophs;

C: Syntrophic propionate-oxidizing bacteria; D: Composite image of A, B, and C. <http://journals.im.ac.cn>

定时间、脱水时间和甲酰胺浓度,对某公司 UASB 反应器污泥样品同时进行 3 种探针的 FISH 操作,并进行 DAPI 染色,结果如图 1 所示,图 1 中 A、B、C 分别是 DAPI 染色、食丁酸盐产氢产乙酸细菌探针和食丙酸盐产氢产乙酸细菌探针的杂交观察结果,图 1.D 由图 1.A、1.B、1.C 经过 Image-Pro Plus 软件合成得到,白色区域反映了与 3 种探针都有结合。

Hansen 和 Harmsen 曾经分别运用膜杂交技术和原位杂交技术对生物反应器中食丁酸盐产氢产乙酸细菌或食丙酸盐产氢产乙酸细菌进行了考察^[8~10]。但是两者选取的探针种类较少,检测的产氢产乙酸细菌种类和范围狭窄,代表性差,尤其是 Harmsen 仅仅对一到两种食丙酸盐产氢产乙酸菌株进行了分析。更重要的是,对具体实验操作条件交待不详,无法考察探针的特异性,亦不能进行重复实验。而本文优化得到的 FISH 技术,采用多个种属水平的特异性探针,摸索和提供了对产氢产乙酸细菌直接进行原位分析的具体条件,提高了探针特异性,可以分别或同时检测不同种类的产氢产乙酸细菌,具有较强的可重复性。

2.2 不同环境样品中产氢产乙酸细菌的数量

采用优化得到的 FISH 检测条件对 6 种环境样品进行了定量检测,分析获得的食丁酸盐产氢产乙酸细菌、食丙酸盐产氢产乙酸细菌、总产氢产乙酸细菌以及总微生物的数量,如表 3 所示。从表 3 可见,6 种厌氧环境样品中,食丁酸盐产氢产乙酸细菌数量都远远大于食丙酸盐产氢产乙酸细菌数量,前者比后者大致高 1 个数量级。食丁酸盐产氢产乙酸细菌含量最高的是来自 UASB 反应器污泥,达到 1.53×10^9 cells/mL 样品,比其他 5 种样品高 1 个数量级;其他 5 种样品食丁酸盐产氢产乙酸细菌含量大致相同。UASB 污泥和奶牛场牛粪中都含有较多的食丙酸盐产氢产乙酸细菌,DSM 柠檬酸厂 IC 反应器污泥和下水道污泥中的食丙酸盐产氢产乙酸细菌含量处于同一数量级,太湖底泥中的食丙酸盐产氢产乙酸细菌数量最少,比 DSM 柠檬酸厂 IC 反应器污泥和奶牛场牛粪低了 2 个数量级。与此相对应,UASB 污泥和奶牛场牛粪中总产氢产乙酸细菌数量最多,这说明这 2 种生境的生存条件比较理想,有利于产氢产乙酸细菌的生长繁殖。

表 3 几种环境样品中的产氢产乙酸细菌丰度

Table 3 Abundance of syntrophic acetogenic bacteria in environmental samples						
Microorganism	UASB sludge	Sediment in Taihu lake	Sludge in sewers	DSM/IC sludge	Cattle manure	Digesting sludge
Saturated fatty acid- β -oxidizing syntrophs (cells/mL sample $\times 10^9$)	1.53 \pm 0.05	0.11 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01	0.68 \pm 0.02	0.43 \pm 0.05	0.21 \pm 0.04
Syntrophic propionate-oxidizing bacteria (cells/mL sample $\times 10^8$)	1.70 \pm 0.04	0.08 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.54 \pm 0.01	2.28 \pm 0.19	0.26 \pm 0.03
Syntrophic acetogenic bacteria (cells/mL sample $\times 10^9$)	1.70 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01	0.73 \pm 0.02	0.65 \pm 0.04	0.25 \pm 0.03
Total microrganism (cells/mL sample $\times 10^{10}$)	0.82 \pm 0.01	3.40 \pm 0.14	2.42 \pm 0.06	3.60 \pm 0.10	9.55 \pm 0.54	3.79 \pm 0.27

不同环境样品中产氢产乙酸细菌相对丰度不同,即占总微生物的比例不同,如图 2 所示。图 2 显示,UASB 污泥中食丁酸盐产氢产乙酸细菌相对含量最高,占总微生物的 18.7%,DSM 柠檬酸厂 IC 反应器污泥中食丁酸盐产氢产乙酸细菌相对含量也比较高,占总微生物的 1.89%,其他 5 中环境样品中的

食丁酸盐产氢产乙酸细菌相对含量比率大致相同。食丙酸盐产氢产乙酸细菌相对含量最高的是 UASB 污泥,其他环境样品中的食丙酸盐产氢产乙酸细菌相对含量都比较低。总产氢产乙酸细菌相对丰度比较高的是 UASB 污泥和 DSM 柠檬酸厂 IC 反应器污泥,分别为 20.78% 和 2.04%,因为这 2 种生境中含

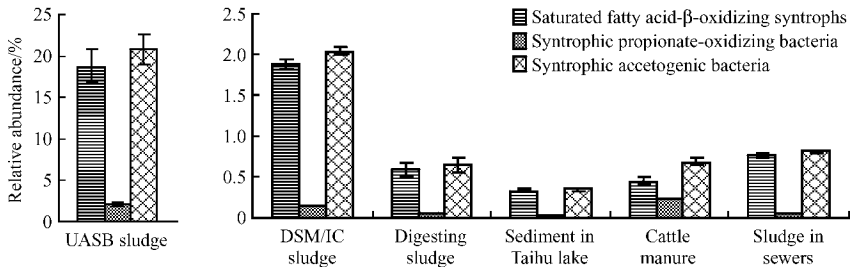


图 2 产氢产乙酸细菌相对丰度

有较高的糖量。比较食不同基质产氢产乙酸细菌种群的数量关系,发现每种样品中食丁酸盐产氢产乙酸细菌都比食丙酸盐产氢产乙酸细菌数量高得多,这可能是由于食丁酸盐产氢产乙酸细菌探针结合和检测的细菌范围广于食丙酸盐产氢产乙酸细菌探针的缘故。

分析环境样品,可以看到,废水处理厌氧反应器中含有较多的产氢产乙酸细菌,尤其是处理含糖量较高的厌氧反应器,糖转化为有机酸的数量多,基质丰富,有利于产氢产乙酸细菌的生存与增殖。反刍动物瘤胃中也生存有一定量的产氢产乙酸细菌,数量也比较多。相比较而言,湖底沉积物中产氢产乙酸细菌数量最少。

本文运用 FISH 技术,定量了多种不同种类的产氢产乙酸细菌,同时,调查了多种厌氧环境中产氢产乙酸细菌的情况,对于反映这类细菌在不同生境中的生存、分布和数量等信息提供了参考。而 Hansen^[8]和 Harmsen^[9,10]主要了解了产氢产乙酸细菌和其互营细菌甲烷细菌之间的相互关系等,并没有对产氢产乙酸细菌进行定量等其他方面的分析,且考察的生境很少,基本只涵盖了厌氧生物反应器。所以,本研究采用的 FISH 技术弥补了 Hansen 和 Harmsen 研究的这一缺陷。

2.3 FISH 方法和其它方法比较

为进一步检测本文所建 FISH 方法的准确性和可行性,对建立的 FISH 方法和其他文献报道的其他方法检测产氢产乙酸细菌的结果进行了比较,如表 4 所示。国内外专门针对产氢产乙酸细菌的定量研

究都比较少,所报道的产氢产乙酸细菌计数方法绝大多数采用了 MPN 法^[16~18]。竺建荣等人应用 MPN 方法计数得到的 UASB 反应器污泥中产氢产乙酸细菌的数量是 4.3×10^8 个/mL。一般来讲,不同来源的样品之间可比性不高,其差异也不一定就是方法造成的,为了对两种方法进行比较,选择与此相对应的几乎相同的生境和样品对比发现,本文采用 FISH 方法检测到的 UASB 反应器污泥中产氢产乙酸细菌数量是 1.70×10^9 cells/mL 样品,其中食丁酸盐产氢产乙酸细菌和食丙酸盐产氢产乙酸细菌分别为 1.53×10^9 cells/mL 样品、 1.70×10^8 cells/mL 样品,比竺建荣等人检测到的 4.3×10^8 个/mL 高 1 个数量级。这可能主要因为产氢产乙酸细菌是严格厌氧细菌,不能在纯培养条件下很好的生长,部分产氢产乙酸细菌甚至不能在纯培养条件下生长,需要与耗氢菌互营才能良好生长,这是依赖纯培养的 MPN 方法固有的局限。任馨等人同样采用了 MPN 方法对淹水底泥中产氢产乙酸细菌进行了计数,但结果表达比较模糊,本文采用 FISH 方法检测到的太湖底泥中产氢产乙酸细菌数量叙述清晰详细,为 0.12×10^9 cells/mL 样品,其中食丁酸盐产氢产乙酸细菌和食丙酸盐产氢产乙酸细菌分别为 0.11×10^9 cells/mL 样品、 0.08×10^8 cells/mL 样品。从结果比较可见,FISH 方法的检测范围更加广泛,结果也更加准确,尤其是检测结果可以具体到特定细菌。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。

表 4 不同产氢产乙酸细菌计数方法结果比较

Table 4 Comparison of FISH and MPN for detecting syntrophic acetogenic bacteria

Method	Sample	Saturated fatty acid- β -oxidizing Syntrophs	Syntrophic propionate-oxidizing bacteria	Syntrophic acetogenic bacteria	Reference
FISH	UASB (cells/mL sample)	$(1.53 \pm 0.05) \times 10^9$	$(1.70 \pm 0.04) \times 10^8$	$(1.70 \pm 0.01) \times 10^9$	This study
	Sediment in Taihu lake (cells/mL sample)	$(0.11 \pm 0.01) \times 10^9$	$(0.08 \pm 0.01) \times 10^8$	$(0.12 \pm 0.01) \times 10^9$	
MPN	UASB (cells/mL)	/	/	4.3×10^8	5, 6, 7
	flooded paddy soil (cells/g)	/	/	7.0	

因此,在对产氢产乙酸细菌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。FISH 技术具有快速、简便、准确的优点,为难以分离培养的微生物的计数提供了一条新的途径。

3 结论

(1) 经过优化,确定 FISH 技术检测产氢产乙酸细菌的实验条件为样品固定 19h、乙醇脱水 5min,杂交缓冲液中甲酰胺浓度 55% ;

(2) 厌氧消化反应器、反刍动物瘤胃和河底沉

积物等厌氧环境中都有一定数量的产氢产乙酸细菌。其中废水处理 UASB 厌氧反应器污泥中产氢产乙酸细菌数量为 1.70×10^9 cells/mL 样品,占总样品中总微生物的 20.78%;比其他生境中的产氢产乙酸细菌高一个数量级,丰度高 10% 左右。

(3) 本文建立的 FISH 方法和传统 MPN 计数方法相比,操作快捷,且可以同时检测多类不同种属水平的产氢产乙酸细菌,结果精确,因此在环境微生物生态学研究中具有较好的应用价值。

致谢 感谢浙江大学闵航教授对本文的审读和修改!

参 考 文 献

- [1] Bryant MP, Wolin EA, Wolin MJ, et al. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Archiv für mikrobiologie*, 1967 **59**: 20–31.
- [2] Bernardina LM, van Kuijk, Alfons JM Stams. Sulfate reduction by a syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1995, **68**: 293–296.
- [3] 程光胜,屠雄海,东秀珠.厌氧降解丁酸共培养物中产氢产

酸细菌与产甲烷细菌的分离与再组合. *微生物学报*, 1995 **35** (6): 442–449.

- [4] 张春杨,刘晓黎,东秀珠.豆腐废水 UASB 反应器中的原核生物多样性及主要功能菌群. *微生物学报*, 2004 **44** (2): 141–147.
- [5] 任馨,吴伟祥.转 Bt 基因克螟稻秸秆对淹水土壤细菌群落的影响. *环境科学学报*, 2004 **24** (5): 871–877.
- [6] 徐向阳,冯孝善.工业有机废水为共基质培养降解五氯酚厌氧颗粒污泥. *环境科学*, 2001 **22** (3): 108–122.
- [7] 竺建荣,胡纪萃,顾夏声.厌氧颗粒污泥中的产氢产乙酸细菌研究. *微生物学通报*, 1994 **21** (4): 207–209.
- [8] Hansen KH, KAhring B, Raskin L. Quantification of syntrophic fatty acid- β -oxidizing bacteria in a mesophilic biogas reactor by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (11): 4767–4774.
- [9] Hermie JM, Hamsen H, Kengen MP, et al. Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, 1996 **62** (5): 1656–1663.
- [10] Hermie JM, Hamsen A, Akkermans DL. Population dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** (6): 2163–2168.

Quantitative use of fluorescence in situ hybridization to detect syntrophic acetogenic bacteria in anaerobic environmental samples

LI Yan-na¹, XU Ke-wei¹, DU Guo-cheng^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}, LIU He^{1*}

(¹ Laboratory of Environmental Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

(² Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China)

Abstract Syntrophic acetogenic bacteria, an important functional one in anaerobic habitats, were detected and counted by fluorescence in situ hybridization (FISH) technology by using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. For enumeration and quantification of the targeted bacteria, an attempt was made to optimize the hybridization conditions. The optimum conditions are as follows: a fixation time of 19h, a dehydrated time of 5min, and a formamide concentration of 55% in hybridized solution. The abundance of syntrophic acetogenic bacteria of different environmental samples were quantified by FISH and the results showed that Upflow Anaerobic Sludge Reactor (UASB) treating STHZ high-concentration organic wastewater and the digestive tract of some animals were the main habitats of syntrophic acetogenic bacteria. The numbers of syntrophic acetogenic bacteria in UASB and cattle manure were 1.70×10^9 cells/mL sample and 6.50×10^8 cells/mL sample, respectively. Meanwhile, the sediments of rivers and lakes existed less of the bacteria and the contents of them were just about 1.20×10^8 cells/mL sample in Taihu lake.

Keywords: syntrophic acetogenic bacteria; fluorescence in situ hybridization; oligonucleotide probes; anaerobic system

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (50508014); National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA06Z315)

* Corresponding author. Tel 86-510-85918310; Fax 86-510-85918309; E-mail liuhe@jiangnan.edu.cn

Received 3 March 2007/Accepted: 3 August 2007/Revised 7 September 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>