ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第37卷 第6期

Vol.37 No.6

2016

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版

环境科学 (HUANJING KEXUE) ENVIRONMENTAL SCIENCE 第37卷 第6期 2016年6月15日

目　次

微丝菌(*Microthrix parvicella*)原位荧光杂交(FISH)定量过程的条件优化

王润芳[1,2],张红[1],王琴[3],王娟[1],顾剑[2],齐嵘[1*],杨敏[1]

(1. 中国科学院生态环境研究中心,北京 100085; 2. 北京北排水环境发展有限公司水质检测中心,北京 100022; 3. 河北大学化学与环境科学学院,保定 071002)

摘要:微丝菌(*Microthrix parvicella*)是世界范围内诱发活性污泥膨胀现象的主要丝状菌之一,它在活性污泥中准确的原位定量解析对污泥膨胀现象及控制策略研究具有非常重要的意义. 由于微丝菌自身的特殊生理生化性质(如表面高疏水性及较厚细胞壁)易导致常规荧光原位杂交(FISH)过程中定量结果偏低. 本研究针对 FISH 过程中存在的探针渗透率低、荧光信号偏弱等现象, 从活性污泥样品前处理、杂交过程条件等方面对 *Microthrix parvicella* 的 FISH 定量过程进行了优化. 结果表明,在 前处理使用溶菌酶(浓度为36 000 U·mL^{-1}),探针浓度为 4.5 ng·μL^{-1},杂交时间延长至 4 h 的条件下,*Microthrix parvicella* 的 FISH 定量结果可从 1.12% 提高至 96.70%,并与定量 PCR(q-PCR)结果和 Eikelboom & Jenkins 法(镜检观察)定量结果更为趋近一致.

关键词:污泥膨胀; 微丝菌; FISH 技术; 优化; 定量

中图分类号: X172 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2016)06-2266-05 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.2016.06.033

Optimization for *Microthrix parvicella* Quantitative Processing of Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

WANG Run-fang[1,2], ZHANG Hong[1], WANG Qin[3], WANG Juan[1], GU Jian[2], QI Rong[1*], YANG Min[1]

(1. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. Water Quality Testing Center, Beijing Drainage Water Environment Development Co., Ltd., Beijing 100022, China; 3. College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: Precise quantification of *Microthrix parvicella*, which is identified as a dominated filamentous bacterium of bulking sludge in the worldwide, is essential for bulking investigation and related control strategies. However, quantitative processing based on fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is prone to interference due to the specific characteristics of *Microthrix parvicella* (hydrophobic surface with thick cell wall). Our study focused on pretreatment and process optimization to show that the proportion of *Microthrix parvicella* was increased from 1.12% to 96.70% benefited by lysozyme (36 000 U·mL^{-1}), high probe concentration (4.5 ng·μL^{-1}) and longer hybridization time (4 h) employed, mapping with the results of q-PCR method and Eikelboom & Jenkins Observation.

Key words: sludge bulking; *Microthrix parvicella*; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); optimization; quantitative

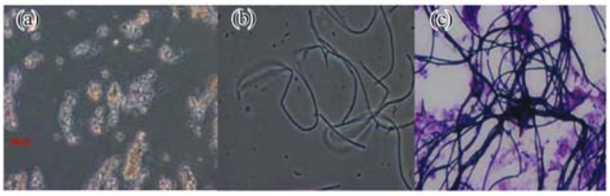
在城市污水生物处理工艺的运行过程中,污泥膨胀造成的二沉池泥水分离困难现象,不仅会引起出水悬浮物浓度升高、污染物处理效率下降,严重时甚至导致整体生物工艺的崩溃[1~3]. 有研究报道指出,90%以上的污泥膨胀是由丝状菌(filamentous bacteria)的过量繁殖引起的[4],而微丝菌(*Microthrix parvicella*)则是在世界范围内诱发城市污水处理厂污泥膨胀现象的主要丝状菌[5~10]. 为了更好地解决污泥膨胀对工艺正常运行的困扰,活性污泥中的优势丝状菌,特别是 *M. parvicella* 的准确定性定量分析在膨胀机制研究及控制中尤为重要.

针对 *M. parvicella* 的快速定性,目前多采用 Eikelboom & Jenkins 法进行显微镜镜检,从形态学角度进行快速鉴定[11],但定量分析结果较为粗略[12]. 定量 PCR(q-PCR)尽管可以准确获得 *M. parvicella* 的数量变化[13],但结果无法分辨其在菌胶团中的生长位置对污泥沉降性的影响. 荧光原位杂交(FISH)技术同时结合上述两种方法的优点,既可比镜检法更为准确地定量 *M. parvicella* 的数目变化,同时又能以直接证据的形式表现出 *M. parvicella* 形态的变化趋势,成为膨胀机制研究中重要的解析方法之一. 但 *M. parvicella* 为革兰氏阳性菌,且细胞壁较厚,传统方法下的目标探针穿透效果较差,造成与胞内靶向 DNA 的结合效率下降,影响最终的荧光信

收稿日期: 2015-12-07; **修订日期**: 2016-01-24
基金项目: 国家自然科学基金项目(51378489, 31170468)
作者简介: 王润芳(1989~),女,硕士,主要研究方向为污水生物处理污泥膨胀解析及控制,E-mail: Wangrunf@126.com
* 通讯联系人,E-mail: qirong@rcees.ac.cn

号通量,引起定量结果的无规律波动[14,15].

本研究根据 *M. parvicella* 的生理生化特点,在常规荧光原位杂交技术的基础上,通过样品前处理优化、杂交过程参数优化等多种方式,系统提高 FISH 杂交效率,较为准确地获得其在活性污泥中的比例数据,以期为膨胀机制及控制研究奠定扎实的科学数据基础.



(a)相差 100×下,丰度为 5 级;(b)*M. parvicella*(相差 1 000×);(c)*M. parvicella*(革兰氏染色 1 000×)

图 1　活性污泥中优势丝状菌

Fig. 1　Dominant filamentous bacteria in activated sludge

1　材料与方法

1.1　样品的采集及固定

样品采于某城市污水处理厂污泥膨胀期曝气池的活性污泥,经 Eikelboom & Jenkins 法镜检表明:丝状菌丰度为 5,优势丝状菌为 *M. parvicella*(如图 1).

离心管取样 2 mL,于12 000 $r\cdot min^{-1}$离心 5 min,去上清,加入 1 mL 的冷冻乙醇,摇匀 −20℃ 保存.

1.2　FISH 定量过程

FISH 操作步骤见文献[16].选用探针信息如表 1 所示.

样品于荧光显微镜下观察(OLYMPUSBX51),阳性 *M. parvicella* 为红色(TRITC),活细菌为绿色(FITC),全细菌为蓝色(DAPI),每视野拍摄 3 组,共 10 个视野,采用 Image J 计数求平均.

由于 *M. parvicella* 本身的生理特性,造成探针渗透性差,荧光信号不强.根据报道[18,19],针对前处理方法(1 $mol\cdot L^{-1}$ HCl、变溶菌素、溶菌酶)、探针浓度(1.5、3.0、4.5 $ng\cdot \mu L^{-1}$)和杂交时间[20~22](2、3、4 h)进行了系统优化研究.

1.3　Real time-PCR 定量过程

普通 PCR 和 q-PCR 具体步骤参考文献[23 ~ 25].引物信息如表 2 所示.

表 1　探针的选择

Table 1　Probes used in this study

探针	目的菌	探针序列	多聚甲醛/%	5′-探针	文献
MPAmix(MPA60 + MPA223 + MPA645)	*M. parvicella* + *Candidatus. M. calida*	GGATGGCCGCGTTCGACT + GCCGCGAGACCCTCCTAG + CCGGACTCTAGTCAGAGC	20	TRITC	[19]
EUB338mix (Bact338)	Most bacteria	GCTGCCTCCCGT AGG AGT	35	FITC	[17]

表 2　引物的选择

Table 2　Primers used in this study

目的菌	引物名称	探针序列(5′-3′)	文献
M. parvicella + *Candidatus. M. calida*	M1 M2	GGTGTGGGGAGAACTCAACTC GACCCCGAAGGACACCG	[26]
细菌	341F 534R	CCTACGGGAGGCAGCAG TTACCGCGGCTGCTGGCAC	[27]

2　结果与分析

2.1　不同探针浓度下的定量结果对比

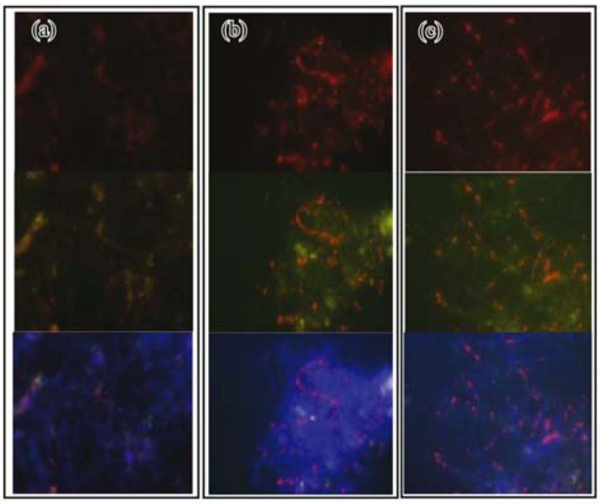
随着探针浓度的提高,探针与目标菌结合程度逐步提高,目标菌的荧光信号明显增强,如图 2 所示,当探针浓度为 4.5 $ng\cdot \mu L^{-1}$时,*M. parvicella* 占活菌的比例(MPAmix/EUB)从 1.12% 提高到 12.36%.

2.2　不同杂交时间下的定量结果

在优化探针浓度为 4.5 $ng\cdot \mu L^{-1}$后,考察不同杂交时间(2、3、4 h)对定量结果的影响,结果如图 3 所示.杂交时间对荧光强度和 *M. parvicella* 形态有着明显的影响,随着杂交时间的延长,探针的渗透性增加,其与目标菌结合得越完全,目标菌荧光数量和荧光强度都显著增加,且表现出来的形态越完整.*M. parvicella* 占活菌的比例从 13.30% 提高到 33.30% (图 3).

2.3　不同前处理条件下的定量结果研究

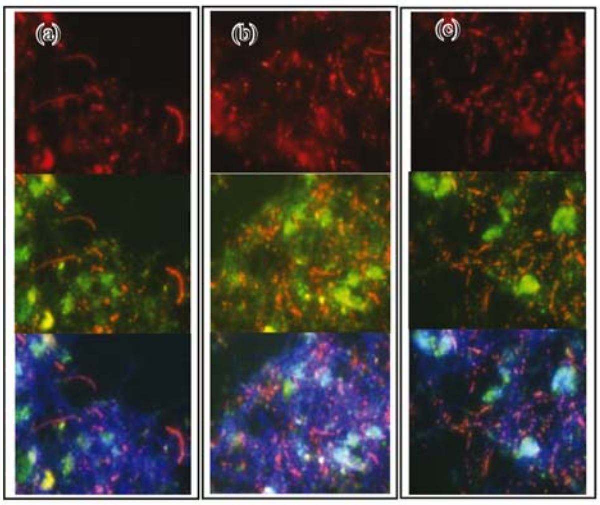
样品经脱水固定后,可以采取不同的方法进行前处理以提高探针的透过效率.酸处理可以使细胞



(a)探针浓度为 1.5 ng·μL^{-1}时,自上至下依次为 MPAmix、MPAmix/EUB、MPAmix/EUB 叠加 DAPI 的图片;(b)探针浓度为 3.0 ng·μL^{-1}时,自上至下依次为 MPAmix、MPAmix/EUB、MPAmix/EUB 叠加 DAPI 的图片;(c)探针浓度为 4.5 ng·μL^{-1}时,自上至下依次为 MPAmix、MPAmix/EUB、MPAmix/EUB 叠加 DAPI 的图片

图 2 不同探针浓度下 *M. parvicella* 的 FISH 图片

Fig. 2 FISH analysis of *M. parvicella* under different probe concentrations

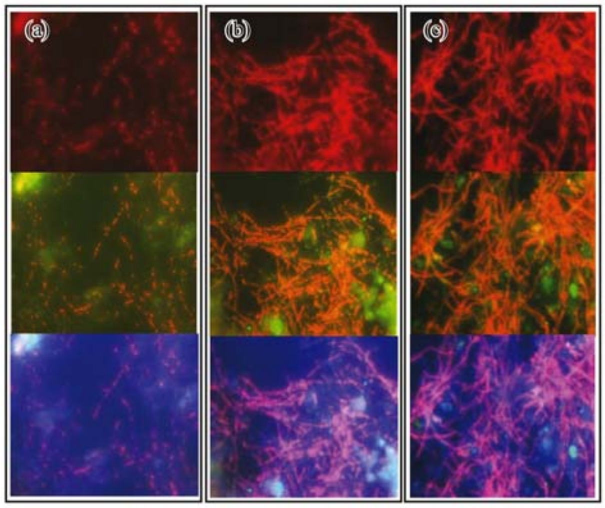


(a)杂交时间 2 h 时,自上至下依次为 MPAmix、MPAmix/EUB、MPAmix/EUB 叠加 DAPI 的图片;(b)杂交时间 3 h 时,自上至下依次为 MPAmix、MPAmix/EUB、MPAmix/EUB 叠加 DAPI 的图片;(c)杂交时间 4 h 时,自上至下依次为 MPAmix、MPAmix/EUB、MPAmix/EUB 叠加 DAPI 的图片

图 3 不同杂交时间下 *M. parvicella* 的 FISH 图片

Fig. 3 FISH analysis of *M. parvicella* at different hybridization time

壁蛋白质水解,降低对探针的干扰,增加探针穿透性;变溶菌素则主要作用于连接 *N*-乙酰胞壁酸和 *N*-乙酰葡萄糖胺的 β-1,4 糖苷键,使细胞壁得以裂解增加荧光强度[28];溶菌酶主要通过破坏细胞壁中的 *N*-乙酰胞壁酸和 *N*-乙酰氨基葡糖之间的 β-1,4 糖苷键,使细胞壁不溶性黏多糖分解成可溶性糖肽,从而提高荧光信号[29,30]. 在采取不同的前处理方法后,如图 4 所示,酸处理并未引起明显变化,而变溶菌素、溶菌酶的使用则显著增强了荧光信号,且 *M. parvicella* 形态有较完整的表达. 溶菌酶前处理方法下 *M. parvicella* 形态更接相差下的观察状态,无断点且光滑. 因此,在不同前处理下条件下,*M. parvicella* 的比例高低依次为溶菌酶 > 变溶菌酶 > 1 mol·L^{-1} HCl.



(a)前处理方法为 1 mol·L^{-1} HCl 时,自上至下依次为 MPAmix、MPAmix/EUB、MPAmix/EUB 叠加 DAPI 的图片;(b)前处理方法为变溶菌素时,自上至下依次为 MPAmix、MPAmix/EUB、MPAmix/EUB 叠加 DAPI 的图片;(c)前处理方法为溶菌酶时,自上至下依次为 MPAmix、MPAmix/EUB、MPAmix/EUB 叠加 DAPI 图片

图 4 不同前处理下 *M. parvicella* 的 FISH 图片

Fig. 4 FISH analysis of *M. parvicella* with different pretreatment methods

2.4 FISH 定量结果与 q-PCR 定量结果的比较

在确认优化的各项条件后,*M. parvicella* 在活性污泥中定量结果的比例显著提高. 为了更为准确地检验优化条件的作用,将不同优化状态下的 FISH 定量结果与 q-PCR 定量结果进行了比较,结果如表 3 和表 4 所示.

不难看出,q-PCR 定量结果稳定在 80% 左右,而变溶菌素和溶菌酶的优化结果可以分别达到 91% 和 96%. 由于方法原理不同,FISH 定量与 q-PCR 定量结果的绝对值之间并不存在数学比较意义. 但从污泥膨胀研究的角度出发,特别是考虑到对象的客观比例,相差观察定量、FISH 定量及 q-PCR 定量三者之间的比例数值应大致符合一定范

围,从更多的角度为 *M. parvicella* 客观比例数值提供较为匹配的横向比较,为今后的研究提供更为准确的科学数据基础.

表 3　FISH 定量数据

Table 3　Quantification of *M. parvicella* by FISH

条件		*M. parvicella*/EUB/%
①探针浓度/ng·μL^{-1}	1.5	1.12 ± 0.36
	3.0	8.22 ± 1.10
	4.5	12.36 ± 1.79
②杂交时间/h	2	13.30 ± 1.96
	3	20.24 ± 2.10
	4	33.30 ± 2.14
③前处理	1 mol·L^{-1} HCl	31.64 ± 2.39
	变溶菌素	91.43 ± 3.21
	溶菌酶	96.70 ± 3.08

1)①无前处理,杂交时间 2 h; ②无前处理,探针浓度 4.5 ng·μL^{-1}; ③探针浓度 4.5 ng·μL^{-1},杂交 4 h

表 4　q-PCR 定量数据

Table 4　Quantification of *M. parvicella* by q-PCR

细菌 ×10^8/copies·μL^{-1}	*M. parvicella* ×10^8/copies·μL^{-1}	*M. parvicella*/细菌 /%
1.77 ± 0.02	1.42 ± 0.03	79.88 ± 0.52

3　结论

(1)本研究针对因 *M. parvicella* 本身生理特性导致荧光信号差,FISH 定量结果偏低的实验现象,通过探针浓度、杂交时间及前处理方法等优化,显著提高了定量结果的准确性. 探针浓度为 4.5 ng·μL^{-1},杂交时间为 4 h,采用溶菌酶作为前处理得到的最终荧光信号更为完整与稳定地显示了 *M. parvicella* 在活性污泥中的原位形态.

(2)优化后的 FISH 方法通过 10 组(*M. parvicella*/EUB)平均计算结果 *M. parvicella* 占活菌比例稳定在 96%,q-PCR 结果稳定在 80%. 尽管这两种方法由于原理不一,无法进行直接数值比较,但考虑到客观一致性,优化后杂交方法对种群的定量优势描述更与其他定量方法趋近一致,可以为今后研究提供更为准确的科学数据基础.

参考文献:

[1] Zheng S K, Sun J Y, Han H. Effect of dissolved oxygen changes on activated sludge fungal bulking during lab-scale treatment of acidic industrial wastewater [J]. Environmental Science & Technology, 2011, **45**(20): 8928-8934.

[2] Mielczarek A T, Kragelund C, Eriksen P S, *et al*. Population dynamics of filamentous bacteria in Danish wastewater treatment plants with nutrient removal [J]. Water Research, 2012, **46**(12): 3781-3795.

[3] Graveleau L, Cotteux E, Duchène P. Bulking and foaming in France: the 1999-2001 survey [J]. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, 2005, **33**(3): 223-231.

[4] 王萍, 余志晟, 齐嵘, 等. 丝状细菌污泥膨胀的 FISH 探针研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2012, **18**(4): 705-712.

[5] Noutsopoulos C, Mamais D, Andreadakis A. A hypothesis on *Microthrix parvicella* proliferation in biological nutrient removal activated sludge systems with selector tanks [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, **80**(2): 380-389.

[6] Hamit-Eminovski J, Eskilsson K, Arnebrant T. Change in surface properties of *Microthrix parvicella* upon addition of polyaluminium chloride as characterized by atomic force microscopy[J]. Biofouling, 2010, **26**(3): 323-331.

[7] Noutsopoulos C, Mamais D, Andreadakis A. Long chain fatty acids removal in selector tanks: evidence for insufficient *Microthrix parvicella* control [J]. Desalination and Water Treatment, 2010, **23**(1-3): 20-25.

[8] Xie B, Dai X C, Xu Y T. Cause and pre-alarm control of bulking and foaming by *Microthrix parvicella*-a case study in triple oxidation ditch at a wastewater treatment plant[J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, **143**(1-2): 184-191.

[9] Rossetti S, Tomei M C, Nielsen P H, *et al*. "*Microthrix parvicella*", a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: a review of current knowledge[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, **29**(1): 49-64.

[10] Andreasen K, Nielsen P H. Growth of *Microthrix parvicella* in nutrient removal activated sludge plants: studies of in situ physiology[J]. Water Research, 2000, **34**(5): 1559-1569.

[11] Eikelboom D H. Filamentous organisms observed in activated sludge[J]. Water Research, 1975, **9**(4): 365-388.

[12] Jenkins D, Richard M D, Daigger G L. Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation separation problems (3rd ed)[M]. London, UK: IWA Publishing, 2003. 17.

[13] Vanysacker L, Denis C, Roels J, *et al*. Development and evaluation of a TaqMan duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of Candidatus *Microthrix*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, **97**: 6-14.

[14] Oerther D B, de los Reyes Ⅲ F L, de los Reyes M F, *et al*. Quantifying filamentous microorganisms in activated sludge before, during, and after an incident of foaming by oligonucleotide probe hybridizations and antibody staining[J]. Water Research, 2001, **35**(14): 3325-3336.

[15] Bradford D, Christensson C, Jakab N, *et al*. Molecular biological methods to detect "*Microthrix parvicella*" and to determine its abundance in activated sludge[J]. Water Science and Technology, 1998, **37**(4-5): 37-45.

[16] Nielsen P H, Daims H, Lemmer H, *et al*. FISH handbook for biological wastewater treatment: identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH[M]. London, UK: IWA Publishing, 2009. 74-84.

[17] Daims H, Brühl A, Amann R, *et al*. The domain-specific probe

EUB338 is insufficient for the detection of all *bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1999, **22**(3): 434-444.

[18] Marneri M, Mamais D, Koutsiouki E. *Microthrix parvicella* and *Gordona amarae* in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion systems [J]. Environmental Technology, 2009, **30**(5): 437-444.

[19] Erhart R, Bradford D, Seviour R J, *et al*. Development and use of fluorescent *in situ* hybridization probes for the detection and identification of "*Microthrix parvicella*" in Activated Sludge[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1997, **20**(2): 310-318.

[20] 张星, 林炜铁, 朱雅楠. FISH 技术定量解析亚硝酸盐氧化菌的条件优化[J]. 环境科学学报, 2009, **29**(4): 716-722.

[21] 张勇, 宋吟玲, 史俊, 等. FISH 法检测生物膜中硝化细菌流程的建立及优化[J]. 环境科技, 2009, **22**(4): 34-37.

[22] 张勇, 宋吟玲. 荧光原位杂交法检测反应器中聚磷菌实验条件优化及应用[J]. 环境科学管理, 2008, **33**(2): 126-129.

[23] Lienen T, Kleyböcker A, Verstraete W, *et al*. Foam formation in a downstream digester of a cascade running full-scale biogas plant: influence of fat, oil and grease addition and abundance of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella*[J]. Bioresource Technology, 2014, **153**: 1-7.

[24] Zhang V X, Zhou H D, Theodoulou M, *et al*. Quantification of *Microthrix pavicella* and *Gordonia* species using quantitative real-time PCR (qPCR) in submerged membrane bioreactors for municipal wastewater treatment[A]. In: Proceedings of the Water Environment Federation[C]. [S. l.]: WEFTEC, 2010. 5614-5629.

[25] Kumari S K S, Marrengane Z, Bux F. Application of quantitative RT-PCR to determine the distribution of *Microthrix parvicella* in full-scale activated sludge treatment systems [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, **83**(6): 1135-1141.

[26] Kaetzke A, Jentzsch D, Eschrich K. Quantification of M*icrothrix parvicella* in activated sludge bacterial communities by real-time PCR[J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, **40**(3): 207-211.

[27] Koike S, Krapac I G, Oliver H D, *et al*. Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73**(15): 4813-4823.

[28] 刘同军, 徐文琳, 张玉臻. 变溶菌素(Mutanolysin)研究历史和发展前景[J]. 微生物学报, 2000, **40**(2): 224-227.

[29] 陈艳, 江明锋, 叶煜辉, 等. 溶菌酶的研究进展[J]. 生物学杂志, 2009, **26**(2): 64-66.

[30] 叶丹, 连宾. 溶菌酶及其应用[J]. 贵州科学, 2003, **21**(3): 67-70.

HUANJING KEXUE Vol. 37 No. 6
Environmental Science (monthly) Jun. 15, 2016

CONTENTS

环境科学

（HUANJING KEXUE）

（月刊　1976 年 8 月创刊）

2016 年 6 月 15 日　第 37 卷　第 6 期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

（Monthly　Started in 1976）

Vol. 37　No. 6　Jun. 15，2016

主　管	中国科学院
主　办	中国科学院生态环境研究中心
协　办	（以参加先后为序） 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院
主　编	赵进才
编　辑	《环境科学》编辑委员会 北京市 2871 信箱（海淀区双清路 18 号，邮政编码：100085） 电话：010-62941102，010-62849343 传真：010-62849343 E-mail：hjkx@ rcees. ac. cn http：//www. hjkx. ac. cn
出　版	科学出版社 北京东黄城根北街 16 号 邮政编码：100717
印刷装订	北京北林印刷厂
发　行	科学出版社 电话：010-64017032 E-mail：journal@ mail. sciencep. com
订购处	全国各地邮电局
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 （北京 399 信箱）

Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
Editor-in -Chief		ZHAO Jin-cai
Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science（HUANJING KEXUE） P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel：010-62941102，010-62849343；Fax：010-62849343 E-mail：hjkx@ rcees. ac. cn http：//www. hjkx. ac. cn
Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing　100717, China
Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
Distributed	by	Science Press Tel：010-64017032 E-mail：journal@ mail. sciencep. com
Domestic		All Local Post Offices in China
Foreign		China International Book Trading Corporation（Guoji Shudian）, P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号：ISSN　0250-3301 / CN　11-1895/X　　国内邮发代号：2-821

国内定价：120.00 元　　国外发行代号：M 205

国内外公开发行