

FISH 技术在污水生物除磷脱氮研究中的应用

颜 强¹, 谢有奎²

(1.重庆大学 建筑设计研究院,重庆 400045;2.后勤工程学院 军事建筑与环境工程系,重庆 400041)

摘要:在简单介绍荧光原位杂交(FISH)的基本原理后,着重讨论了该技术在污水生物除磷、脱氮工艺中的应用现状、特点和前景。尽管污水生物除磷、脱氮工艺的宏观性能与微生物相的关系密切,但因缺乏适宜的检测技术,对工艺系统中微生物类型、数量和结构等了解还很不充分。研究表明:FISH技术能够为除磷菌、硝化菌的识别与再分类提供优越的检测手段;与聚合酶链反应(PCR)等其它技术相结合,可使FISH技术更具生命力。

关键词:污水生物处理;除磷;脱氮;荧光原位杂交;微生物识别

中图分类号:X703.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-7329(2004)06-0071-03

Application of FISH in Biological Removal of Nitrogen and Phosphorus from Wastewater

YAN Qiang¹, XIE You - kui²

(1. Institute of Architecture and Design, Chongqing University, Chongqing 400045, P. R. China; 2. Department of Architecture and Environmental Engineering, LEU, Chongqing 400041, P. R. China)

Abstract: The application of Fluorescence In - situ Hybridization (FISH) to research of biological removal of nitrogen and phosphorous from wastewater was discussed after a brief introduction of its principal theory. Though there exists close relationship between macroscopical performance of biological removal of nitrogen and phosphorous and the state of microorganism, the sort, quantity and structure of microbes inside the wastewater treating system had not been well understood yet because of lack of proper examining technology. The research shows that FISH can provide an excellent examining method for identification and sub - classification of polyphosphate accumulating organisms (PAO) and nitrifying bacteria. Moreover, the combination of FISH with other methods such as polymerase chain reaction (PCR) can make it more powerful.

Keywords: biological treatment of wastewater; nitrogen removal; phosphorous removal; Fluorescence In - situ Hybridization (FISH); identification of microbes

在污水净化和污染水环境生物修复领域,已研发和应用了许多技术经济性能良好的生物除磷、脱氮系统,如 Bardenpho 工艺、SBR 系列、氧化沟工艺和 A/A/O 工艺等,还出现了同时硝化 - 反硝化工艺(SND)及 SHARON - ANAMMOX 悬浮系统等新工艺、新技术。然而对这些除磷、脱氮系统中微生物相的研究还远远不够。如:已发现在没有明显的厌氧区或缺氧区的 Orbal 型氧化沟内,可同时去除有机物及氮磷(SBNR),但不知道其中的除磷微生物是否与传统的强化生物除磷(EBPR)工艺相同^[1];尽管微生物结构、尤其是优势微生物种类,似乎与 SRT、pH 和温度等操作条件及处理效果间存在强烈的联系,但目前甚至很少关注细菌种群类型(生物膜结构)、数目与代谢活性(生物膜功能)测定相联系这一重要问题^[2]。这与培养计数等传统鉴定方法的测量精度不够存在直接关系^[3]。因此在深入研究污水除磷、脱氮处理

* 收稿日期:2004-09-05

作者简介:颜 强(1971-),男,重庆黔江人,硕士,工程师,主要从事水污染控制方向的研究。

工艺微生物相、优化系统氮磷去除效果时,急需引入更加准确高效的微生物定性、定量技术。近年的一些试验表明,荧光原位杂交(FISH)技术可能是识别除磷细菌和脱氮细菌的最有效方法之一^[1-5]。

1 荧光原位杂交技术

FISH 技术问世于 20 世纪 70 年代后期,是在原来的同位素原位杂交技术基础上发展起来的。其基本原理是^[6,7],按照两个核酸的碱基序列互补原则,用特殊修饰的核苷酸分子标记 DNA 探针,然后将标记的探针直接原位杂交到染色体或 DNA 纤维切片上,再与荧光素分子偶联的单克隆抗体和探针分子特异性结合,经荧光检测系统和图形分析技术对染色体或 DNA 纤维上的 DNA 序列定位、定性和相对定量。该方法主要包括探针选择与标记、靶组织选择、变性和杂交、检测与显色等步骤。FISH 技术的探针有 DNA 探针、RNA 探针、低聚核苷酸探针,常用的是 DNA 探针^[8]。依其性质及来源不同,可将探针分为基因组探针、单一序列探针、染色体特异性探针和染色体文库探针四类^[9,10]。探针标记可采用酶法或化学法。探针种类、浓度、标记率、标本预处理、试剂质量、杂交混合液的离子强度和温度等许多因素均影响杂交的效果。由于 FISH 技术涉及标记、杂交、标本制备等多个复杂技术环节,需熟练掌握其技术要领才能保证染色体原位杂交效果和检测精度^[11],因此操作者事前应接受较为严格的训练。FISH 技术已在许多领域获得广泛应用,可用于生物染色体畸变检测与基因定位^[12,14]。余利岩和姚天爵^[15]采用 FISH 技术鉴定 Actinobacteria,发现该法具有完整、准确和直观的优点。余利岩^[16]等还比较了 FISH 方法和体外 PCR 扩增-琼脂糖电泳分析法鉴定 Actinobacteria 种属的效果,表明两者的结果比较一致,只是 FISH 法准确、直观,但耗时较长且较复杂;而 PCR 方法更简单,可用于大量初筛菌株的同时鉴定。大量应用实例表明,FISH 技术具有下列特点:①操作简便、探针标记后稳定。②方法敏感,测定迅速。③可同时用多种探针检测同一个标本。④不仅可用于分裂期细胞染色体数量或结构变化研究,也可用于间期染色体数量及基因改变的研究。目前,该技术本身还处于继续发展完善中,已衍生为一个技术系列,出现了原位杂交显带(ISHB)、反向染色体涂色(reverse chromosome painting)、多色荧光原位杂交(mFISH)、DNA 纤维-FISH(DNA fiber-FISH)、原位 PCR-FISH(in situ PCR-FISH)、锁链探针-FISH(pad probe-FISH)等^[10,13]。

2 FISH 技术在除磷、脱氮方面的应用

尽管荧光原位杂交技术在医学中已获广泛应用,但在污水生物净化研究中却应用较少。在过去的污水处理研究和实际污水处理厂运行过程中,表征污水处理效果的主要方法是测定污染物的进出水浓度和去除率,或以原生动物和后生动物的数量、组成和活性间接描述。对大肠杆菌等细菌则采用多管发酵法和滤膜法一类培养-计数方法。这类方法难以对污水处理装置内生态系统的微生物结构做深入的剖析和适时动态监测^[1]。近年来,污水生物法除磷、脱氮机理的深入研究,以及对污水处理装置的不断优化,迫切需要更加快速、准确和精细的分析手段来定性、定量处理系统中特定细菌并剖析其群落结构。污水处理领域的一些研究者开始尝试将荧光原位杂交技术用于除磷菌和脱氮细菌分析,取得了初步成功。Kawaharasaki 等^[3]采用 DAPI 荧光染料和 α -、 β -和 γ -Proteobacteria 特异性低聚核苷酸探针,对厌氧/好氧序批式 EBPR 反应器中活性污泥聚磷酸盐积累菌(PAO)进行了识别。结果表明,所采用的 FISH 技术是现场识别 PAO 细菌的有效方法,可为稳定操作 EBPR 工艺提供有用的监控信息。Biesterfelder 和 Figueroa^[2]在运用荧光原位杂交技术和批次规模反应器,评价全规模硝化滴滤池中硝化生物膜随时间的变化情况时注意到,Jureschko 等研究者已经将 FISH 技术用于生物膜和活性污泥样品中硝化菌的识别。他们还发现,在确定全规模硝化系统性能下降由硝化菌数量减少还是活性暂时受到抑制时,FISH 是一种有效的处理工具。对特定微生物种群定性和定量时,应采用 FISH 一类以微生物学为基础的方法而不是以活性为基础的测定方法。而且 FISH 技术具有获得结果更快,可自动读取、保存和回顾载物片信息等优势。Biesterfelder 及其合作者^[4]稍后继续采用类似方法,研究了硝化生物膜结构与功能的关系,进一步确认 FISH 技术无损测定氨氧化菌群的可行性。Zilles 等^[1]在研究曝气-缺氧 Orbal 型氧化沟工艺中

强化生物除磷机理时,采用流动血细胞计数法和荧光原位杂交技术对沟内活性污泥样品的微生物相进行了富集和定量,并未在这些全规模污水处理厂污泥中检测到占优势的 PAO 种属。采用 TaqI 限制酶和限制性片断长度多晶型分析(RFLP)技术,对污泥富集 PAO 样品进行再次测试,得出了较为理想的结果。我国的张丹等^[5]也运用荧光原位杂交分子生物学检测技术,对 OLAND 生物脱氮系统的硝化菌群进行了定量,获得满意的结果。

3 FISH 技术在除磷脱氮研究中的应用展望

FISH 技术在医学等领域已是一门较成熟的检测技术,但在污水除磷、脱氮研究中的应用还不多。尽管该法具有设备昂贵、操作技能要求高和荧光易淬灭等不足,但专一性强、耗时短、操作简便等众多优势使得 FISH 检测技术的研究不断深入。已有文献表明,在除磷菌、硝化菌和亚硝化细菌的识别以及污水生物除磷脱氮工艺的开发与优化中,FISH 技术能够发挥越来越重大的作用。结合我国国情,适当运用 FISH 等先进的分子生物学检测手段,无疑有助于生物法去除污水磷、氮、有机物研究工作的深入,节约时间并提高污水处理新工艺、新技术开发的技术经济效果。

参考文献:

- [1] Zilles J. L., Peccia J., Noguera D. R.. Microbiologicay of Enhanced Biological Phosphorus Removal in Aerated - Anoxic Orbal Processes[J]. Water Environment Research, 2002, 74(5): 428 - 436.
- [2] Biesterfeld S., Figueroa L., Nitrifying Biofilm Development with Time: Activity versus Phylogenetic Composition[J]. Water Environment Research, 2002, 74(5): 470 - 479.
- [3] Kawaharasaki. M. In Situ Identification of Polyphosphate Accumulating Bacteria in Activated Sludge by Dual Staining with rRNA - targeted Oligonucleotide Probes and 4', 6 - Diamidino - 2 - phenylindol (DAPI) at a Polyphosphate - probing concentration[J]. Water Research, 1999, 33(1): 257 - 265.
- [4] Biesterfeld S., Russell P., Figueroa L.. Linking Nitrifying Biofilm Structure and Function through Fluorescence in Situ Hybridization and Evaluation of Nitrification Capacity[J]. Water Environment Research, 2003, 75(3): 205 ~ 215.
- [5] 张丹,徐慧,刘耀平,等. OLAND 生物脱氮系统运行及其硝化菌群的分子生物学检测[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(5): 530 - 533.
- [6] 马莉贞. 荧光原位杂交技术及其应用[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2001, 19(1): 18 - 21.
- [7] 林汝仙. 荧光原位杂交技术及其应用[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1994, 15(3): 122 - 1124.
- [8] 张颜明. 荧光原位杂交技术及其在肿瘤遗传学研究中的应用[J]. 浙江医科大学学报, 1995, 24(5): 232 - 235.
- [9] 张泽云,金瑾珍. 荧光标记染色体原位杂交技术及其应用[J]. 军事医学科学院院刊, 1994, 18(1): 75 - 79.
- [10] 李牧尧. 荧光原位杂交技术[M]. 北京: 国外医学遗传学分册, 1994, (1): 8 - 13.
- [11] 夏薇,沙滨,崔新羽,等. 荧光原位杂交过程中应注意的几个问题[J]. 吉林医学院学报, 1999, 19(2): 74.
- [12] 刘检好. 荧光原位杂交技术的应用进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 1998, 6(3): 116 - 117.
- [13] 王玲,宁顺斌,宋运淳,等. 荧光原位杂交技术的应用与发展[J]. 植物学报, 2000, 42(11): 1101 - 1107.
- [14] 王永平,郭希明. FISH 技术在贝类分子生物学研究中的应用[J]. 生命科学研究, 2001, 5(4): 283 - 289.
- [15] 余利岩,姚天爵. Actinobacteria 的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2001, 28(5): 36 - 41.
- [16] 余利岩,李秋萍,姚天爵. 两种 Actinobacteria 鉴定方法的比较[J]. 中国抗生素杂志, 2001, 26(1): 10 - 14.