

doi: 10.12068/j.issn.1005-3026.2017.10.022

FISH 检测中国主要油页岩矿区微生物相对丰度

王文星¹, 蒋绍妍², 薛向欣², 侯晓娇¹

(1. 东北大学 生命科学与健康学院, 辽宁 沈阳 110169; 2. 东北大学 冶金学院, 辽宁 沈阳 110819)

摘 要: 用荧光原位杂交(FISH)技术调查了我国主要油页岩矿区(辽宁抚顺、吉林桦甸和广东茂名)中砂土、新鲜油页岩和风化油页岩或砂砾岩样品的细菌和古细菌相对丰度. 油页岩微生物的杂交优化反应条件: 杂交温度为 46 ℃, 杂交时间为 2.5 h, 杂交液中去离子甲酰胺的体积分数为 20% 时, TRIzol 和溶菌酶共处理方式有利于提高杂交率. 各类型样品中, 细菌相对丰度均在 50% 以上, 古细菌相对丰度均在 5% 以下, 在新鲜油页岩中细菌和古细菌的相对丰度最高. 抚顺矿细菌相对丰度最低, 其次茂名矿和桦甸矿, 而抚顺矿古细菌相对丰度最高, 其次茂名矿和桦甸矿.

关 键 词: 油页岩; FISH; 细菌; 古细菌; 相对丰度

中图分类号: X 172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-3026(2017)10-1477-05

Microbial Relative Abundance of Major Oil-Shale Mines in China by FISH Detection

WANG Wen-xing¹, JIANG Shao-yan², XUE Xiang-xin², HOU Xiao-jiao¹

(1. School of Life & Health Sciences, Northeastern University, Shenyang 110169, China; 2. School of Metallurgy, Northeastern University, Shenyang 110819, China. Corresponding author: JIANG Shao-yan, E-mail: jiangshao_1@163.com)

Abstract: The relative abundances of bacteria and archaea in major oil-shale mines (Fushun Mine in Liaoning, Huadian Mine in Jilin and Maoming Mine in Guangdong) of China were investigated by fluorescence in situ hybridization (FISH) method, and three types of samples were collected from each mine, including sandy soil, freshly mined oil-shale and weathered oil-shale or underground sandstone. The optimal hybridization conditions of TRIzol and lysozyme were beneficial to increasing the hybridization rate when the hybridization temperature was 46 ℃, the hybridization time was 2.5 h, and the volume fraction of deionized formamide was 20%. In all samples, the relative abundances of bacteria and archaea are above 50% and below 5%, respectively, and the relative abundances of bacteria and archaea in the freshly mined oil-shale are the highest. The relative abundances of bacteria and archaea are different between any two mines: bacterial relative abundance in Huadian mine is the highest, followed by Maoming mine and Fushun Mine, but archaeal relative abundances are just the reverse.

Key words: oil-shale; FISH; bacteria; archaea; relative abundance

油页岩属于极端环境, 蕴含独特的微生物资源, 尚未被充分了解与利用. 间接证据表明, 微生物在油页岩的沉积和早期地质形成中起到了至关重要的作用^[1]. 这个过程伴随着原始微生物群落的形成. 先前用克隆文库方法对我国主要油页岩矿的细菌和真菌群落进行了调查, 发现超过 50% 的细菌和 1.1% ~ 13.5% 的真菌为未被鉴定种

属^[2-3], 表明经过漫长复杂的地质演化, 在油页岩中逐渐形成了与其环境相适应的特有微生物类群. 还有研究证实, 不同类型页岩中存在需氧和厌氧的异养微生物(如硫酸盐还原菌和发酵菌)、化能自养微生物(如硫细菌和氧化铁细菌)和产甲烷古细菌等^[4]. 此外, 有关页岩微生物降解其有机质的研究尚在起步阶段^[5-7]. 总体上人们对油

页岩微生物的认识与利用仍相当有限,尤其在古细菌方面.通常古细菌都是严格厌氧菌,能被培养的古细菌仅占很少的一部分,且培养条件苛刻,因而要了解其在环境中的分布和数量较为困难.

FISH 技术是一种非放射性的荧光原位杂交技术,可快速准确直观地反映出环境微生物群落的原位分布、形态和相对数量等生态特征,已成为环境微生物检测的强有力工具.本实验用 FISH 技术调查我国主要油页岩矿区(辽宁抚顺、吉林桦甸和广东茂名)的细菌和古细菌的相对丰度及空间分布,有效避免了微生物培养、DNA 抽提和 PCR 扩增带来的偏差,是对我国油页岩环境中微生物资源现状的有益补充,也为油页岩的生物开发利用提供必要的生态学背景.

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

样品采自辽宁抚顺(41°50' N, 123° 57' E)、吉林桦甸(43°00' N, 126°47' E)和广东茂名(21°41' N, 110°58' E)油页岩矿.每矿采集 3 种样品:抚顺矿和茂名矿为露天开采矿,采集新鲜油页岩(依次为 FX 和 MX)、风化油页岩(依次为 FF 和 MF)和矿区内砂土(依次为 FT 和 MT);桦甸矿为井下开采矿,无风化油页岩,因此采集新鲜油页岩(HX)、矿区砂土(HT)和与被采集油页岩层紧邻的砂砾岩(HS).每个样品采集 3 个重复,采样地大小为 20 m × 20 m,间隔约 500 ~ 1 000 m.采样时去掉表层 2 ~ 10 cm,用多点取样法采样.每个点取约等量样品,于取样桶内混匀后过 4 mm 筛子,四分法取适量装入 50 mL 无菌离心管,低温保存带回实验室.所用器具均经高压蒸汽灭菌后烘干使用.实验所用探针均由上海生工生物工程股份有限公司合成. EUB338(细菌探针):5' - GCTGCCTCCCGTAGGAGT - 3', 5' 标记异硫氰酸盐荧光素(FITC),其吸收波长为 492 nm,发射波长为 528 nm; ARCH915(古细菌探针):5' - GTGCTCCCCCGCCAATTCCT - 3', 5' 标记花青 3(CY3),其吸收波长为 550 nm,发射波长为 570 nm^[8].

1.2 实验方法

1.2.1 杂交方法

1) 菌体收集:20 g 样品加入 100 mL PBS (8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH_2PO_4 , 1.56 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 定容至 1 L) 中, 160 r · min⁻¹ 振荡 30 min, 加入 500 μL 的 100 mg · mL⁻¹ 溶菌酶继续

振荡 30 min; 600 r · min⁻¹ 离心 5 min, 将上清液 13 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 合并两次沉淀; 将沉淀重悬于 3 mL PBS 中, 加入等体积质量分数为 60% 的 Nycodenz 密度梯度分离液, 4 ℃ 下, 12 000 r · min⁻¹ 离心 40 min, 收集上清液和中层菌体; 4 ℃ 12 000 r · min⁻¹ 离心 40 min, 收集菌体沉淀; 调整菌液浓度, 使 OD₆₀₀ 约为 1.0.

2) 载玻片处理:2 g 明胶加入 500 mL 水中, 加热溶解, 将灭菌的洁净载玻片放入明胶溶液中浸泡 10 min, 60 ℃ 烘干 2 h, 制成明胶载玻片.

3) 多聚甲醛固定:将步骤 1) 的菌液用 3 倍以上体积分数为 4% 的多聚甲醛 4 ℃ 固定过夜, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 收集菌体. PBS 清洗菌体, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 收集菌体, 重复 3 次. 将收集的菌体重悬在 PBS 中, 4 ℃ 保存.

4) 样品预处理:取 20 μL 步骤 3) 的菌液涂于步骤 2) 的明胶载玻片上, 自然风干; 样品预处理参照 1.2.2 节; 于 -20 ℃ 预冷的 50% , 80% 和 100% 乙醇中依次脱水 3 min, 自然风干.

5) 杂交反应:20 μL 探针杂交液(含 0.02 mol · L⁻¹ Tris - HCl, 0.1% 的 SDS, 0.9 mol · L⁻¹ NaCl, 去离子甲酰胺)体系中探针各 2 μL (50 ng · μL^{-1}) 加在步骤 4) 样品上并封片, 恒温避光杂交. 杂交温度、时间和探针杂交液中去离子甲酰胺浓度参照 1.2.3 节.

6) 杂交后洗脱:将载玻片于 48 ℃ 预热的 50% 甲酰胺/2 × SSC 溶液(50 mL 去离子甲酰胺, 10 mL 20 × SSC 定容至 100 mL; 20 × SSC: 17.6 g NaCl, 8.8 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 调 pH 至 7.2 后定容至 100 mL) 中洗涤 10 min × 3 次; 再于 48 ℃ 预热的 SSC (20 × SSC 稀释 20 倍) 中洗涤 10 min × 3 次; 纯水清洗后自然风干. 步骤 6) 与步骤 7) 需避光.

7) DAPI 染色:60 μL DAPI 染液加在载玻片样品上, 染色 3 ~ 5 min; PBS 洗涤 3 min × 2 次, 纯水清洗后自然风干; 加 10 μL 抗荧光淬灭封片液封片后于倒置荧光显微镜(Leica, 德国)下 1 000 倍镜检.

1.2.2 样品预处理方式优化

设置 2 组实验条件进行比对:一组为溶菌酶(10 mg · mL⁻¹) 37 ℃ 处理 30 min; 另一组为 100 μL TRIzol 试剂常温处理 5 min 后再溶菌酶(10 mg · mL⁻¹) 37 ℃ 处理 30 min.

1.2.3 杂交温度、杂交时间和去离子甲酰胺浓度优化

在文献[9]基础上进行杂交温度、杂交时间

和去离子甲酰胺浓度等杂交条件优化,见表 1.

1.2.4 FISH 检测细菌和古细菌相对丰度

实验样品为抚顺矿 FX,FF,FT;桦甸矿 HX,HS,HT;茂名矿 MX,MF,MT.

方法同 1.2.1,样品预处理方式采用 100 μL TRIzol 试剂常温处理 5 min 后再溶菌酶 (10 mg·mL⁻¹) 37 ℃处理 30 min,杂交温度为 46 ℃,杂交时间为 2.5 h,杂交液中去离子甲酰胺的体积分数为 20% .

每个样品随机观察 10 个视野×3 个平行,记录视野中细菌数、古细菌数和全菌数. 每个样品细菌相对丰度(P_1)、古细菌相对丰度(P_2)及除细菌和古细菌外其他菌相对丰度(P_3)的计算式分别为

$$P_1 = A_a/A \times 100\% ,$$

$$P_2 = A_b/A \times 100\% ,$$
$$P_3 = 1 - P_1 - P_2 .$$
 (1)

式中: A_a,A_b 和 A 分别为细菌、古细菌和全菌的数目,其计算式为

$$A_j = (A_1 + A_2 + A_3)/3 .$$
 (2)

式中: A_j 表示细菌、古细菌或全菌的 3 个平行样品的平均数目, j 代表细菌、古细菌或全菌; $A_1 \sim A_3$ 为细菌、古细菌或全菌的 3 个平行样品的数目. $A_1 \sim A_3$ 的计算式为

$$A_i = (a_{i_1} + a_{i_2} + \cdots + a_{i_{10}})/10 \quad (i = 1,2,3) .$$
 (3)

式中: $a_{i_1} \sim a_{i_{10}}$ 为第 i 个平行样品的 10 个视野中记录的细菌数、古细菌数或全菌数.

表 1 杂交条件优化
Table 1 Optimization of hybridization conditions

变量	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6	组 7
杂交温度/℃	42	42	46	46	46	50	50
杂交时间/h	3	2	2	2.5	3	2	2.5
杂交液中去离子甲酰胺体积分数/%	30	20	30	20	40	25	20

2 结果与讨论

2.1 样品预处理方式优化

利用 FISH 检测不同类群微生物时,所使用的特异性探针、样品中微生物细胞壁的松弛程度及细胞内靶核酸结合探针的能力均各不相同,且杂交时靶核酸与探针不要求完全互补,有限数目非互补碱基对的存在并不影响杂交的发生,加之杂交的专一性和严格性依赖于杂交的盐浓度、温度和时间等,因此通常需要对杂交条件进行优化. 本实验在同样条件下,用溶菌酶 37 ℃处理 30 min (图 1a)与用 TRIzol 常温处理 5 min 后再溶菌酶 37 ℃处理 30 min (图 1b)相比,这两种样品预处理方式的杂交效果差异明显:前者杂交率较低,仅约 20% ,且荧光亮度明暗不一(图 1a - FITC,同一样品 DAPI 染色表征全部微生物,FITC 染色表征细菌);而后者杂交率提高到约 40% (图 1b - FITC,同一样品 DAPI 染色表征全部微生物,FITC 染色表征细菌). 可见,TRIzol 和溶菌酶共处理方式能够明显提高探针与靶核酸的杂交率.

2.2 杂交温度、杂交时间和去离子甲酰胺体积分数优化

当杂交温度为 42 ℃ (图 2)和 50 ℃ (图 3)

时,各组比对实验的杂交效果均不理想,杂交率分别低于 50% 和 30% ,且荧光亮度均明暗不一. 当杂交温度为 46 ℃时(图 4),各组比对实验均取得了较好的效果,与 42 ℃和 50 ℃相比,杂交率明显提高,荧光亮度明显增强. 这说明该温度有利于探针进入细胞内与靶核酸结合,特别是杂交时间 2.5 h、杂交液中去离子甲酰胺体积分数为 20% 时,杂交率接近 100% (图 4 中组 4),且荧光亮度明亮均匀,是一组较理想的杂交条件.

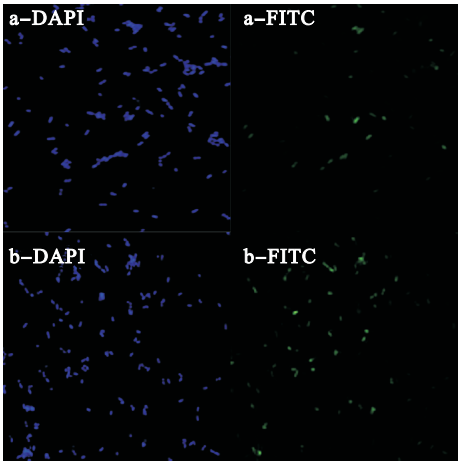


图 1 样品预处理方式的影响
Fig. 1 Effect of sample pretreatment

(a)—溶菌酶 37 ℃作用 30 min;
(b)—TRIzol 作用 5 min 后溶菌酶 37 ℃作用 30 min.

除温度外,杂交时间和杂交液中去离子甲酰胺的体积分数也是影响杂交反应的关键因素. 杂交时间过短会造成杂交不完全(图 4 中组 3), 杂交时间过长会增加碱基错配几率和增大荧光背景,影响荧光信号检测(图 4 中组 5). 杂交温度通常在 37 ~ 50 ℃ 之间,根据探针不同具体温度有一定差异,但若超过 50 ℃,对于保持细胞形态完整和维持细胞粘附于载玻片都较为困难. 另外,杂交液中添加适宜体积分数的去离子甲酰胺可以在降低杂交反应温度的同时,提高杂交特异性.

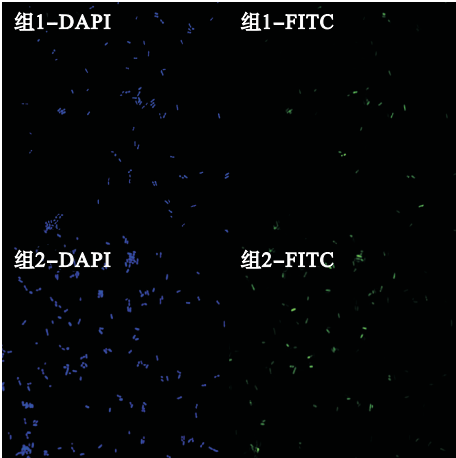


图 2 杂交温度为 42 ℃
Fig. 2 Hybridization temperature at 42 ℃
组 1—3 h, 去离子甲酰胺体积分数为 30% ;
组 2—2 h, 去离子甲酰胺体积分数为 20% .

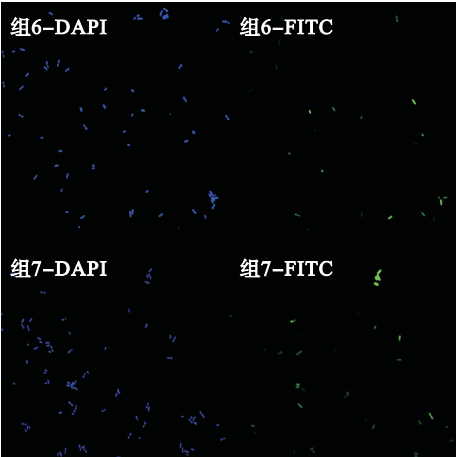


图 3 杂交温度为 50 ℃
Fig. 3 Hybridization temperature at 50 ℃
组 6—2 h, 去离子甲酰胺体积分数为 25% ;
组 7—2. 5 h, 去离子甲酰胺体积分数为 20% .

2. 3 FISH 检测油页岩中细菌和古细菌相对丰度

基于上面的优化条件,用 DAPI 表征微生物总数,EUB338/DAPI 和 ARCH915/DAPI 分别表征样品中细菌和古细菌占微生物总数的比例,即

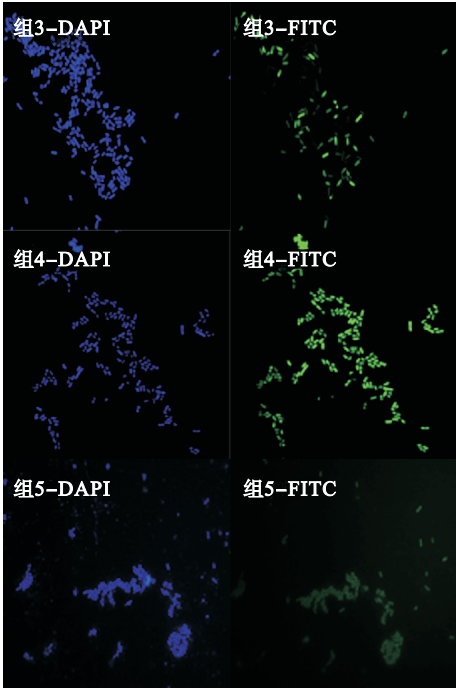


图 4 杂交温度为 46 ℃
Fig. 4 Hybridization temperature at 46 ℃
组 3—2 h, 去离子甲酰胺体积分数为 30% ;
组 4—2. 5 h, 去离子甲酰胺体积分数为 20% ;
组 5 3 h, 去离子甲酰胺体积分数为 40% .

相对丰度. 图 5 是以新鲜油页岩样品为例的全菌染色与使用上述两种探针的 FISH 叠加图像. 细菌为青色,因为目标生物类群为细菌的探针 EUB338,其 5' 端标记的荧光染料 FITC 呈绿色,荧光染料 DAPI 呈蓝色,二者叠加后呈现青色;同理古细菌为粉色,因为目标生物类群为古细菌的探针 ARCH915,其 5' 端标记的荧光染料 CY₃ 呈红色,荧光染料 DAPI 呈蓝色,二者叠加后呈现粉色;除细菌和古细菌之外的微生物依然为 DAPI 的蓝色;而亮黄色等大块荧光物质为杂质.

图 6 为各样品细菌(P_1)、古细菌(P_2)和除这两者外其他菌(P_3)的相对丰度. 对于细菌,首先,所有样品中细菌相对丰度均在 50% 以上,说明在不同矿区、不同类型样品的微生物群落中,细菌都是数量上占绝对优势的类群;由文献[2, 10]可知,茂名矿各样品,尤其是 MT 和 MF,细菌多样性与其他样品相比较差,且其含水量(4. 83% ~ 5. 09%)和 pH 值(3. 14 ~ 4. 79)均较低,从传统纯培养角度看并不适宜细菌生长繁殖,即便如此,其群落中依然有五成以上为细菌类群,说明细菌的生存适应能力更强. 第二,对于每一矿的 3 种类型样品,新鲜油页岩的细菌相对丰度均最高,明显高于同矿砂土和风化油页岩或砂砾岩,这可能与新鲜油页岩中营养成分和能量来源相对最丰富有关. 第

三,抚顺矿各样品细菌相对丰度较其他两矿低,除 FX 为 61.77% 外,该矿其他样品仅为 50% 左右;而桦甸矿各样品均在 60%~70%,且分布差异不大。

对于古细菌,首先,所有样品中古细菌相对丰度均在 5% 以下,说明在不同矿区、不同类型样品中古细菌均为劣势类群。第二,对于每一矿的 3 种类型样品,与细菌结果类似,新鲜油页岩的古细菌相对丰度均最高,其次是风化油页岩或砂砾岩,砂土最低,说明古细菌与细菌一样,对新鲜油页岩具有最好的利用能力。第三,与细菌结果相反,抚顺矿各样品古细菌相对丰度较高,在 0.2%~4.6% 范围内,其中 FF 高达 2.25%,FX 更高达 4.53%;而桦甸矿各样品古细菌相对丰度较其他两矿低,除 HX 为 0.33% 外,该矿其他样品中古细菌所占比例极低(HS)或根本无法检出(HT)。

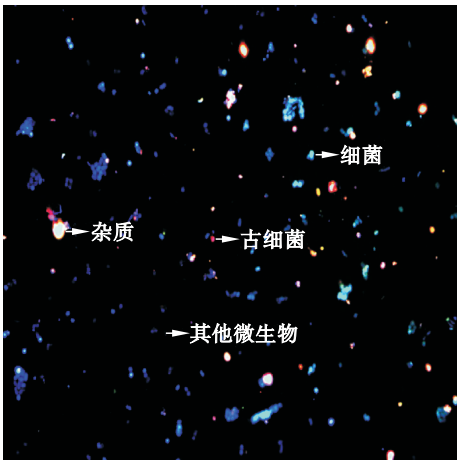


图 5 新鲜油页岩样品的 FISH 图
Fig. 5 FISH image of freshly mined oil-shale sample

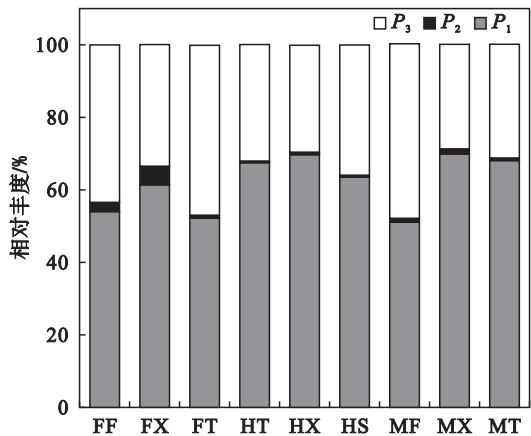


图 6 油页岩样品中微生物的相对丰度
Fig. 6 Relative abundances of microbes in oil-shale samples

3 结 论

1) 杂交温度 46℃、杂交时间 2.5 h、杂交液

中去离子甲酰胺的体积分数为 20% 时,TRIzol 和溶菌酶共处理,杂交率接近 100%,荧光亮度明亮均匀,是一组较理想的油页岩微生物的 FISH 杂交反应条件。

2) 各矿所有样品中,细菌相对丰度均在 50% 以上,新鲜油页岩细菌相对丰度最高。桦甸矿细菌相对丰度最高,其次茂名矿,抚顺矿最低。

3) 各矿所有样品中,古细菌相对丰度均在 5% 以下,其中新鲜油页岩中古细菌相对丰度最高,其次是风化油页岩或砂砾岩,砂土最低。抚顺矿古细菌相对丰度最高,其次茂名矿,桦甸矿最低。

参考文献:

[1] Dyni J R. Geology and resources of some world oil-shale deposits[J]. *Oil Shale*,2003,20(3):193-252.

[2] Jiang S Y,Wang W X,Xue X X,et al. Bacterial diversity in major oil shale mines in China[J]. *Fresenius Environmental Bulletin*,2015,24(10):3176-3188.

[3] Jiang S Y,Wang W X,Xue X X,et al. Fungal diversity in major oil-shale mines in China[J]. *Journal of Environmental Sciences*,2016,41(3):81-89.

[4] Martini A M,Budai J M,Walter L M,et al. Microbial generation of economic accumulations of methane within a shallow organic-rich shale[J]. *Nature*,1996,383(6596):155-158.

[5] Matlakowska R, Sklodowska A. The culturable bacterial isolated from organic-rich black shale potentially useful in biometallurgical procedures [J]. *Journal of Applied Microbiology*,2009,107(3):858-866.

[6] Matlakowska R, Narkiewicz W, Sklodowska A. Biotransformation of organic-rich copper-bearing black shale by indigenous microorganisms isolated from Lubin copper mine (Poland) [J]. *Environment Science Technology*,2010,44(7):2433-2440.

[7] Matlakowska R, Sklodowska A. Biodegradation of Kupferschiefer black shale organic matter (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by indigenous microorganisms [J]. *Chemosphere*,2011,83(9):1255-1261.

[8] Cullander C. Fluorescent probes for confocal microscopy[J]. *Methods in Molecular Biology*,1999,122(1):59-73.

[9] Domingues M R,Araujo J C,Varesche M B,et al. Evaluation of thermophilic anaerobic microbial consortia using fluorescence in situ hybridization (FISH)[J]. *Water Science and Technology*,2002,45(10):27-33.

[10] 蒋绍妍,王文星,薛向欣,等. 利用 PCR-DGGE 分析茂名油页岩矿区土壤细菌群落组成[J]. *中南大学学报(自然科学版)*,2015,46(12):4719-4724.

(Jiang Shao-yan, Wang Wen-xing, Xue Xiang-xin, et al. Composition of bacteria in soil from oil shale mine in Maoming using PCR-DGGE technique [J]. *Journal of Central South University(Science and Technology)*,2015,46(12):4719-4724.)