

聚磷菌体内多聚物的染色方法

Staining methods for intracellular polymers deposited by polyphosphate-accumulating microorganisms

任世英^{1, 2}, 肖 天¹

(1. 中国科学院 海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

中图分类号: Q9393.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096-(2005)01-0059-05

水体的富营养化已经成为世界各国共同面临的重大环境问题,多数水体富营养化的控制因素为磷,因此,污水除磷对防止水体富营养化尤为重要^[1]。目前以生物除磷为主,出现不足再以化学法进行补充。

生物除磷就是利用活性污泥的超量磷吸收现象,即微生物吸收的磷量超过微生物正常生长所需要的磷量,通过污水生物处理系统的设计改进或运行方式的改变使细胞含磷量相当高的细菌群体能在处理系统的基质竞争中取得优势^[2]。生物除磷的过程是:厌氧区,污水中的有机物被发酵产酸菌转化成乙酸,这时聚磷菌将储存在菌体内的聚磷分解,释放出的能量一部分用于聚磷菌在厌氧压抑条件下生存,另一部分用于聚磷菌主动吸收乙酸、 H^+ 和 e^- ,使之以聚 β -羟丁酸的形式储存在菌体内,并使发酵产酸过程继续进行。聚磷菌分解后的无机磷盐释放到聚磷菌外,即为聚磷菌厌氧放磷。好氧区,聚磷菌将储存的聚 β -羟丁酸分解,释放出的大量能量用于聚磷菌生长、繁殖。当环境中溶解磷存在时,一部分能量用于聚磷菌主动吸收磷酸盐,并以聚磷的形式储存在体内,此即为聚磷菌的好氧吸磷。聚磷菌在厌氧条件下生长受到抑制,一进入好氧区,活力将得到充分恢复,此时对磷的吸收大大超过其正常生长所需的磷量,从而达到除磷的目的^[3]。

对除磷起决定作用的是聚磷菌和发酵产酸菌。聚磷菌既能储藏聚 β -羟丁酸,又能积聚磷,一般只能利用低级的低分子脂肪酸,不能直接利用和分解大分子有机物;发酵产酸菌能够将大分子物质降解为小分子物质,所以它的作用不可忽略^[3]。生物除磷系统中,含量最丰富的聚磷菌是聚磷假丝酵母菌^[4],

属于 β -变形菌纲,通常形成 $1.0\sim 1.5\mu m$ 的球杆菌聚合体^[5],菌体内储存多磷酸盐和聚羟链烷酸。遗憾的是,这些聚磷菌尚未得到纯培养。不动杆菌属具有典型聚磷菌的好氧/厌氧代谢途径,但它不是生物除磷污泥中的典型种群。从污泥中分离到的菌,它们的纯培养物在好氧/厌氧条件下,没有典型的聚磷菌代谢途径。俊片菌属种(*Lampromediala*)只储存少量多聚物,而且速度很慢。微半月聚磷菌(*Microcylindrus phosphorus*)具有典型的磷的吸收和释放,但不储存聚羟链烷酸^[6]。通过克隆库(clone libraries)和荧光原位杂交发现,实验室条件下,红环菌(*Rhodocyclus*)在磷含量高的生物除磷体系是优势种^[7]。好氧/厌氧交替时,产生了磷的吸收和释放,但聚羟链烷酸和糖原质的量没有变化,这表明存在聚磷菌的碳源竞争类群,通常称为聚糖原菌^[8]。聚糖原菌属于 γ -变形菌纲,通常形成 $2.5\sim 3.5\mu m$ 的球菌四联体。污泥中也存在高效利用葡萄糖的类群,一般是GC碱基对百分含量高的革兰氏阳性菌,属于 α -变形菌纲^[9]。

生物除磷系统中,有几种途径都可以产生能量。糖原质是合成聚羟链烷酸的主要能量,厌氧三羧酸循环也可能提供部分能量^[10]。对该系统生理生化特性

收稿日期:2004-08-10;修回日期:2004-10-10

基金项目:国家重点基础研究专项经费资助项目(G19990437),国家自然科学基金资助项目(40376048)

作者简介:任世英(1980-),女,山西五寨县人,硕士研究生,主要从事海洋生物学研究,电话:0532-2898584, E-mail: lily-rsy@126.com;肖天,通讯作者,电话:0532-2898586, E-mail: txiao@ms.adio.ac.cn

进行深入研究,发现菌体内的多聚物使聚磷菌对基质有竞争优势。生物除磷不是某种微生物作用的结果,可能是几种微生物共同作用的结果,所以至今都没获得聚磷菌的纯培养^[8]。需要用一定的方法对聚磷菌及其内含物的种类进行鉴定。作者主要介绍了聚磷菌体内多聚物的几种染色方法,包括对多磷酸盐采用的吕氏亚甲基蓝染色,奈瑟氏染色,DAPI染色法;对聚β-羟丁酸采用的苏丹黑染色法;对聚羟链烷酸采用的尼罗蓝染色法。

1 聚磷菌体内多聚物的结构

聚磷菌主要的体内多聚物是多磷酸盐、聚羟链烷酸和糖原质^[11],也有一些特殊的菌,如 *M. phosphovor* 在体内储存海藻糖、多磷酸盐和糖原质,但不储

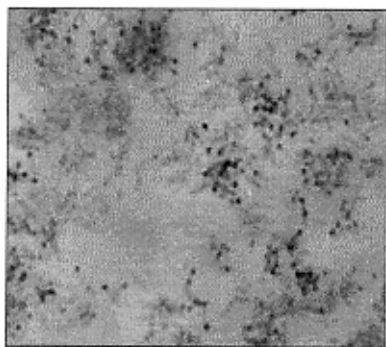


图1 白喉杆菌用美蓝或奈瑟氏染色(Neisser stain)

存聚羟链烷酸^[6]。

1.1 多磷酸盐

首先在迂回螺菌中发现多磷酸盐,所以多磷酸盐又被称为“迂回体”。它是正磷酸单体由酯键结合形成的线性链状或环状多聚物,末端羟基微酸性,中间羟基强酸性,聚合化程度变化非常大。小分子量的多磷酸盐能与金属阳离子或小分子蛋白结合,而高分子量的多磷酸盐能和其他多聚物,如蛋白质、核酸结合。多磷酸盐常作为磷库(核酸的组分)和能源库(形成ATP)。目前广泛认可的生物除磷模式认为,磷释放和聚羟链烷酸储存是代谢相关的,即菌体内多磷酸盐的降解为无氧条件下将碳源转化为聚羟链烷酸提供了部分能量^[11]。

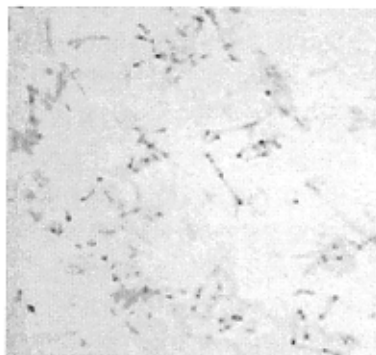


图2 白喉杆菌用 albert 染色

菌体两端或一端有颜色较深的异染颗粒

1.2 聚羟链烷酸

聚羟链烷酸存在于细胞质中,由一层膜包裹,是0.2~0.5 μm的颗粒^[12]。聚磷菌中的聚羟链烷酸是典型的二元多聚物,主要是由3-羟基丁酸和3-羟基戊酸盐组成,也有少量的3-羟基-2-甲基丁酸和3-羟基-2-甲基戊酸盐^[13],多聚物的具体组分由碳源的性质和浓度决定。菌体内聚羟链烷酸最常见的储存形式是聚β-羟丁酸,它是3-羟基丁酸的脂多聚物,也有其他羟基酸的多聚物。厌氧条件下,聚磷菌在菌体内储存聚羟链烷酸,好氧条件下,储存的聚羟链烷酸用于菌体的生长和糖原质的形成^[11]。其分子结构见图3^[14]。

1.3 糖原质和海藻糖

糖原质是分枝状的多聚物,由葡萄糖单体通过

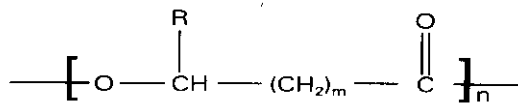


图3 聚羟链烷酸的分子结构

$m = 1, 2$ 和 $3, n$ 为单体链节数目, R 为侧链;当 $m = 1, R$ 是 $-\text{CH}_3$ 时,为 PHB

$\alpha(1 \rightarrow 4)$ 和 $\alpha(1 \rightarrow 6)$ 糖苷键形成,比聚羟链烷酸颗粒更小更分散。厌氧条件下,糖原质降解,聚磷菌利用产生的能量把脂肪酸转化为聚羟链烷酸,好氧条件下,重新形成糖原质^[11]。

只在 *M. phosphovor* 中发现海藻糖,主要由培养基中的酵母膏形成,好氧/厌氧交替培养时,海藻糖的

含量没有很明显的变化。在 *M. phosphovorus* 代谢中,海藻糖的角色还不清楚^[6]。海藻的分子结构见图 4。

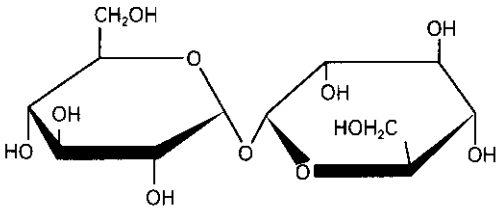


图 4 海藻糖的分子结构^[15]

2 聚磷菌体内多聚物的染色

目前主要先对菌体染色,然后用光学或荧光显微镜观察菌体内的多磷酸盐和聚羟链烷酸。染色方法与化学分析结合能够推动生物除磷的研究,通过染色首先知道污泥中聚磷菌和特征性颗粒的存在,进一步的显微镜观察和化学分析确认多磷酸盐和聚羟链烷酸之间的转化与整个污泥中菌体内被染色颗粒的关系。所以说染色方法对与生物除磷有关的细菌的鉴定和研究中有特别重要的意义。

通过涂片、微火固定等染色步骤,用显微镜观察,能看到菌体内的颗粒着色或发荧光(1 000×)。虽然染色改变了菌体的形态,但通常状况下还是能观察到

表 1 多聚物染色方法及结果

多聚物	染色方法	颗粒颜色	红细胞颜色
多磷酸盐	吕氏亚甲基蓝染色	粉紫色	蓝色
	奈瑟氏染色	紫黑色	黄棕色
	DAPI 染色	黄色	蓝白色
聚 β-羟丁酸	苏丹黑染色	黑蓝色	亮粉色
聚羟链烷酸	尼罗蓝染色	黄色	无荧光
	尼罗蓝染色	偏红	无荧光

颗粒和细胞之间的差别以及颗粒的大小。好氧/厌氧培养时,对菌体分别染色,发现多磷酸盐颗粒和聚羟链烷酸颗粒的数量有明显变化。好氧污泥中用电镜可以观察到菌体内的糖原质颗粒^[16],但糖原质的确定不能单纯使用染色方法,必须结合化学分析。用电镜也能观察到菌体内的多磷酸盐,同时观察到细胞周质空间,细胞表面和细胞质中都有多磷酸盐的储存^[17]。

2.1 多磷酸盐(异染粒)的染色

细胞内的多磷酸盐,也称迂回体或异染粒,通过

染色能观察到。常用染料的有效成分是亚甲基蓝,这种带正电荷的染料对带负电荷的异染粒有很高的亲和力。当异染粒与染料紧密结合,它的光学性质发生改变,产生一种颜色,通过这种颜色就可以区分异染粒和细胞。甲苯胺蓝和亚甲基蓝相似,也能用于异染粒的染色。

用吕氏亚甲基蓝染色,特征性反应是颗粒粉紫色,背景蓝色。当污泥中的菌体内储存大量多磷酸盐时,这种染色方法的效果很好。

奈瑟氏染色时,需把亚甲基蓝溶解在酸性溶液中,因为亚甲基蓝在 pH 值较低(大约 2.8)时才能与多聚物结合,同时也能更好地区分多磷酸盐和细胞。奈瑟氏染色,特征性反应是颗粒紫黑色,背景黄棕色。对于观察多磷酸盐在菌体内储存量的变化,用奈瑟氏染色法比吕氏亚甲基蓝染色法更有效,因为多磷酸盐和细胞之间的差别很明显。好氧污泥中的细菌和已获得纯培养的某些细菌都能在菌体内储存大量的多磷酸盐,因此染色后,整个细胞呈黑紫色或粉紫色。当菌体内储存了大量的多磷酸盐,吕氏亚甲基蓝染色和奈瑟氏染色都出现以上典型现象^[18]。有报道说,用亚甲基蓝对聚 β-羟丁酸和对异染粒染色的结果类似,得出这种结论可能是对染色结果的错误解释。在一株不动杆菌中,菌体内储存了大量聚羟链烷酸,用奈瑟氏染色却无任何上述典型染色结果。对丝状细菌体内多磷酸盐染色,用奈瑟氏染色法更有效^[18]。

DAPI 这种荧光染料常用于 DNA 的染色观察,菌体内的多磷酸盐和脂类物质也能被高浓度的 DAPI (50 mg/L) 染色。DAPI 染色后用荧光显微镜观察,DAPI-DNA 呈蓝白色,而 DAPI-多磷酸盐和 DAPI-脂类呈黄色。菌体内多磷酸盐和脂类可以通过染色后荧光的强度来区分:DAPI-脂类的荧光较弱,几秒后就会猝灭,而 DAPI-多磷酸盐的荧光呈亮黄色,不易猝灭^[16]。所有用 DAPI 染色的菌体,都是使用 330~385 nm 的激发光进行观察。用高浓度的 DAPI (50 mg/L) 对菌体内的多磷酸盐染色时,会出现背景荧光强度过高的问题^[19],使用低 DAPI 浓度 (1 mg/L) 和长时间 (1 h) 的方法染色可以避免这个问题^[20]。用 DAPI 染色后,区分菌体内多磷酸盐颗粒和脂类有一定难度^[21],对于这个问题,可以先用尼罗蓝染色观察菌体内聚羟链烷酸的储存状况,再用 DAPI 染色。DAPI

染色法能与荧光原位杂交结合,所以近几年在生物除磷研究中使用 DAPI-多磷酸盐染色大大增加^[21]。

2.2 聚羟链烷酸的染色

聚羟链烷酸用苏丹族染料染色后,再用相差显微镜(1 000×)观察,发现它在菌体内呈具有折射性的颗粒。在组织化学中,苏丹族染料常用于细胞内是否存在脂类物质的检测。苏丹族染料可以进入脂类物质内部,在脂类中的溶解性比在染料溶液中高,特别是苏丹黑,能够将所有脂类物质染色,所以已被用于聚 β -羟丁酸的染色观察中^[22]。

用尼罗蓝对聚羟链烷酸颗粒染色效果更好。尼罗蓝的氧化形式有尼罗红和尼罗粉 2 种,这 2 种形式在水溶液中同时存在,尼罗红能溶于中性脂类(该脂类在 55℃呈液态,能被聚羟链烷酸吸收)。尼罗蓝染色后,使用 460 nm 和 546 nm 激发光观察,菌体内的聚羟链烷酸颗粒发荧光。有报道说可以使用蔡司滤片 set 9 和 set 15 对尼罗蓝染色结果进行观察,效果都不错,用 set 9 观察到的聚羟链烷酸颗粒呈黄色荧光;set 15 则偏红。细胞膜和其他细胞成分没有吸收足够的染料,所以不发荧光。尼罗蓝不能用于糖原质和多磷酸盐颗粒的染色,它对石蜡和脂肪这些脂类物质的着色能力大于对聚羟链烷酸的着色能力^[23]。菌体内聚羟链烷酸含量越高,尼罗蓝染色后的荧光越强,所以能用于估计好氧/厌氧条件下聚羟链烷酸储存量的变化,同时它的发射光强度很大,在低放大倍数下也能观察到菌体内储存的聚羟链烷酸。

2.3 多磷酸盐和聚羟链烷酸双染

Rees 等^[24]描述了在同一菌体中两种颗粒——聚羟链烷酸和多磷酸盐颗粒的染色方法:先用尼罗蓝再用亚甲基蓝对不动杆菌的纯培养物进行染色,观察染色后的菌体,出现了多磷酸盐发亮光,聚羟链烷酸发荧光。这种双染法已被用于生物除磷混合污泥的研究中,有时结果也不是很满意^[10],在有些生物除磷混合污泥研究中出现了聚羟链烷酸荧光降低和多磷酸盐反应的缺失,产生这种现象的原因还不清楚。多磷酸盐聚合的程度在不同条件下和不同细菌中有很大的差异,双染法能够区分聚磷菌内储存的多磷酸盐链的长度和多磷酸盐/聚羟链烷酸的比例。双染法可以用来核对用这两种染料单独染色时所得到的结果。近来有报道说将 DAPI 染色法、苏丹黑染色法与荧光原

位杂交结合,可以用来观察同一细胞中储存的两种颗粒^[25]。

以上介绍的染色方法各有利弊,需要继续改进,这对于聚磷菌代谢途径和菌体内含多聚物的鉴定研究是必需的,从而更好地应用于生物除磷。

参考文献:

- [1] 王莉红,汪玲. 废水除磷技术的发展趋势[J]. 云南师范大学学报, 2003, 23(增): 89-92.
- [2] 聂福胜. 回流污泥浓缩池在污水生物除磷工艺中的应用[J]. 西南给排水, 2004, 26: 1-3.
- [3] 涂保华,张洁. 生物除磷及其新工艺[J]. 能源环境保护, 2003, 17: 25-27.
- [4] Saunders A M, Oehmen A, Blackall L L, et al. The effect of GAOs (glycogen accumulating organisms) on anaerobic carbon requirements in full-scale Australian EBPR plants[J]. *Water Sci Technol*, 2003, 47: 37-43.
- [5] Caterina Levantesi, Luisa Serafim, Gregory R Crocetti, et al. Analysis of the microbial community structure and function of a laboratory scale enhanced biological phosphorus removal reactor[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4: 559-567.
- [6] Santos M M, Lemos P C, Reis M A M, et al. Glucose metabolism and kinetics of phosphorus removal by fermentative bacterium *Microlunatus phosphovorius*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3920-3928.
- [7] Hesselmann R P X, Werlen C, Hahn D, et al. Enrichment phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge[J]. *Syst Appl Microbiol*, 1999a, 22: 454-465.
- [8] Zeng R J, Yuan Z, Keller J. Model-based analysis of anaerobic acetate uptake by a mixed culture of polyphosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 83: 293-302.
- [9] Tsai C S, Liu W T. Phylogenetic and physiological diversity of tetrad-forming organisms in deteriorated biological phosphorus removal systems[J]. *Water Sci Technol*, 2002, 46: 179-184.
- [10] Hesselmann R P X, Von Rummel. Anaerobic metabolism of bacteria performing enhanced biological phosphate removal[J]. *Water Res*, 2000, 34: 3 487-3 494.
- [11] Satoh H, Mino T, Matsuo T. Uptake of organic substrates and accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under

- anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal processes[J]. **Water Sci Technol**, 1992, 26: 933 – 942.
- [12] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters [J]. **Prog Polym Sci**, 2000, 25: 1503 – 1555.
- [13] Liu W T. Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic – aerobic activated sludge without biological phosphorus removal[J]. **Water Res**, 1996, 30: 75 – 82.
- [14] 朱博超, 焦宁宁. 生物降解脂肪族聚酯合成技术进展 [J]. **合成纤维**, 2003, 6: 9 – 12.
- [15] 马春玲, 王瑞明, 刘建军. 海藻糖的性质及其生产 [J]. **山东食品发酵**, 2003, 3: 9 – 12.
- [16] Smolders G J F, Van der Meij. Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1994, 43: 461 – 470.
- [17] Bond P L, Rees G N. Microbiological aspect of phosphorus removal in activated sludge system[M]. Boston: Kluwer Academic Publishing, 1999. 227 – 256.
- [18] Lindrea K C, Seviour E M, Seviour R J, *et al*. Practical methods for the examination and characterization of activated sludge[M]. Boston: Kluwer Academic Publishing, 1999. 257 – 293.
- [19] Liu W T, Nielsen A T, Wu J H, *et al*. In situ identification of polyphosphate-and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial population in a biological phosphorus removal process [J]. **Environ Microbiol**, 2001, 3: 110 – 122.
- [20] Zilles J L, Hung C H, Noguera D R. Presence of *Rhodocyclus* in a full – scale wastewater treatment plant and their participation in enhanced biological phosphorus removal [A]. International Water Association. Proceedings 3rd IWA International Specialized Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Process [C]. Rome Italy, 2001. 75 – 81.
- [21] Kawaharasaki M, Tanaka H, Kanagawa, *et al*. identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludges by dual staining with r-RNA targeted oligonucleotide probes (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration [J]. **Water Res**, 1999, 33: 257 – 265.
- [22] Murray R G E, Doetsch R N. Determinative and cytological light microscopy [J]. **American Society for Microbiology**, 1994, 6: 21 – 41.
- [23] Spiekermann P, Rehm B H A, Kalscheuer R, *et al*. A sensitive, viable – colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds [J]. **Arch Microbiol**, 1999, 171: 73 – 80.
- [24] Rees G N, Vasiliadis G, May J W, *et al*. Differentiation of polyphosphate and poly-hydroxybutyrate granules in *Acinetobacter* sp isolated from activated sludge [J]. **FEMS Microbiol Lett**, 1992, 94: 171 – 174.
- [25] Tsai C S, Liu W T. Phylogenetic and physiological diversity of tetrad-forming organisms in deteriorated biological phosphorus removal system[A]. International Water Association. Proceedings 3rd IWA International Specialized Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Process [C]. **Rome Italy**, 2001. 131 – 137.

(本文编辑: 张培新)