

河口水体和沉积物中微生物的分离培养与鉴定

Isolation and Identification of Microorganisms in Estuarine Water Column and Sediments

段丽^{1,2}, 王攀登^{1,2}, 李佳岭^{1,2}, 李文均^{1,2,*}

¹ 生命科学学院, 中山大学, 广州, 广东; ² 南方海洋科学与工程广东省实验室 (珠海), 珠海, 广东

*通讯作者邮箱: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

引用格式: 段丽, 王攀登, 李佳岭, 李文均. (2021). 河口水体和沉积物中微生物的分离培养与鉴定. Bio-101 e2003742. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003742.

How to cite: Duan, L., Wang, P. D., Li, J. L. and Li, W. J. (2021). Isolation and Identification of Microorganisms in Estuarine Water Column and Sediments. Bio-101 e2003742. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003742. (in Chinese)

摘要: 河口作为淡水和海洋的交汇处, 具有复杂多变的生境, 细菌群落的多样性也维持在较高的水平。然而, 目前纯培养的微生物不足总数的 0.1%, 分离培养技术依旧是研究环境微生物的重点也是难点, 而且尤其缺乏对河口环境微生物的针对性研究, 十分不利于河口微生物资源的挖掘。本文中阐述的方法适用于分离河口环境中可培养细菌, 充分发掘河口微生物资源。根据本实验室以往实验经验, 选用了效果较好的两种培养基: 1/10 R2A 和 1/20 MA。这两种培养基的优势在于, 在 R2A 培养基中添加额外的海盐成分, 有助于更好地模拟原生环境; 而将培养基充分稀释则有利于抑制优势类群的过快生长, 从而提高分离菌株的多样性。实验者也可根据样品理化性质调整分离培养基及培养条件, 以达到更好的分离效果。本文中的方法能够帮助在实验室条件下分离培养河口环境中的微生物, 初步了解河口可培养微生物的多样性, 并为后续的新分类单元的鉴定、功能菌株的筛选以及代谢产物的发掘输送优质的微生物资源。

关键词: 河口微生物, 分离培养, 微生物初步鉴定, 纯培养

材料与试剂

1. 无菌 PCR 管
2. 10 ml 注射器

3. 15 ml 无菌离心管
4. 0.22 μ m 无菌有机系滤膜
5. 各种型号的枪头 (20 μ l, 200 μ l, 1 ml)
6. Marine Broth 2216 (BD, Difco)
7. R2A Broth (Coolaber)
8. 海盐 (酷尔生物)
9. 琼脂 (Solarbio)
10. 制霉菌素 (BBI Life Sciences)
11. Chelex (Bio-Rad, SIGMA)
12. PCR MIX (GenStar)
13. 细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Sangon Biotech)
14. 二甲基亚砜 (aladin, 优级纯)

仪器设备

1. 研钵
2. 研磨棒
3. 涂布棒
4. 接种针
5. 无菌培养皿
6. 100 ml 锥形瓶
7. 超净工作台
8. 高温高压灭菌锅
9. 恒温震荡箱
10. PCR 仪
11. 离心机
12. 电泳仪

软件和数据库

1. EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) (Yoon *et al.*, 2017)

实验步骤

1. 事前准备:

- 1) 样品: 水样 N1 个, 沉积物样品 N2 个, 共 N 个
- 2) 稀释梯度: 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} , 共 M 个
- 3) 培养基: 共 X 个
 - a) 1/10 R2A' (额外添加 2%海盐)
 - b) 1/20 MA
- 4) 样品盐度: 2%-3%
- 5) 培养温度: 28 °C

2. 样品预处理:

对于沉积物样品, 需要提前进行烘干处理。准备 N2 个无菌培养皿和取样勺, 取适量充分混匀的样品, 并铺满培养皿底部, 放在通风橱自然风干 1-2 d; 水样无需提前处理。

3. 材料准备:

需要提前准备并灭菌的材料和试剂有:

- 1) 研钵及配套研磨棒 N2 个
- 2) 锥形瓶 N2 个, 并加入少许玻璃珠和 20 ml 纯水
- 3) 10 ml 注射器若干
- 4) 纯水 1 L
- 5) 无菌培养皿 $N \times M \times X$ 个
- 6) 1 ml 和 200 ml 枪头若干
- 7) 涂布棒若干
- 8) 15 ml 无菌离心管 $N \times M$ 个
- 9) 50 mg/ml 制霉菌素原液

4. 分离培养基配制:

根据培养基配方配制适量培养基, 调至合适 pH, 高温灭菌后, 待培养基冷却至 50 °C 左右, 以 1 ml/L 的浓度加入制霉菌素原液, 充分混匀, 倒入无菌培养基中, 自然风干 3-4 d, 培养基灭菌后的操作在超净工作台中进行。

5. 沉积物样品稀释:

- 1) 待培养基和样品风干完成后, 首先将样品研磨至无明显大颗粒物, 每个样品称取 2 g 放入锥形瓶中, 放入 28 °C 振荡培养箱中振荡 1 h 左右。
- 2) 准备 $N2 \times M$ 个离心管, 首先用注射器在所有离心管中加入 9 ml 纯水备用。
- 3) 将振荡完成样品充分摇匀, 吸取 1 ml 到离心管中, 此时稀释梯度为 10^{-2} , 充分震荡混合, 标记样品名和稀释梯度, 然后梯度稀释至 10^{-4} , 每次吸取前注意充分摇匀。

6. 水样稀释:

与沉积物样品稀释类似, 将样品充分摇匀后梯度稀释至离心管中即可。

7. 样品涂布:

样品稀释完成后, 每个离心管中吸取 100 μ l 到培养皿, 用涂布棒充分涂匀, 直至液体完全消失, 然后在每个培养皿上做好标签, 一般需要包含培养基简称、样点名、稀释梯度及时间等信息, 封口后放入保藏箱 28 °C 培养 1-2 周。

8. 纯化培养基配制:

待已涂布的培养皿上有少许单菌落出现时, 可以提前准备纯化培养基。一般选用原浓度的 R2A。配前需提前预估待纯化的菌株数量, 可准备同等数量的培养皿 (单板), 或者半数 (二分板) 和四分之一数量 (四分板)。与配制分离培养基类似, 待培养基灭菌后, 加入制霉菌素, 自然风干 3-4 d 备用。

9. 菌株纯化:

待分离培养皿上的单菌落长到合适的丰度时, 可开始下一步的纯化。先用记号笔在培养皿的底部标记好待纯化的菌株, 并将其按顺序编号。挑选的原则是: 单菌落必须与周围菌落存在一定的距离, 以避免接种针在挑取过程中误触杂菌; 另外, 尽量全面挑取不同颜色、大小的菌落以避免重复, 但比较小的类似菌落可适当多挑, 因为这些菌落可能还未完全分化为成熟的形态。培养皿未开封时可以在超净工作台外进行观察。挑选完成后, 在超净工作台中利用接种针挑取单菌落到纯化板上, 单板需采用三区划线法, 二分板和四分板只需一区即可, 但不同菌之间需要保留足够的距离。接种完成后, 对每株菌做好标记, 一般为分离培养皿编号加上该平板上计数的菌株编号, 总编号最好保持在 5 位数字/字母内。

10. 菌株初步测序鉴定:

- 1) 纯化培养皿培养 2-3 d 后, 基本会生长出较为明显的菌落, 此时可根据菌株的生长状况进行分批测序鉴定。
- 2) 观察并记录每株菌的生长状况、颜色以及特殊形态 (如产丝、产色素等)。
- 3) 挑取适量菌体到装有 50 μ l Chelex 溶液的 PCR 管中, 溶液变浑浊即可 (沈德新等, 2004)。
- 4) 放入 PCR 仪器中, 99 °C 加热 30 min。
- 5) 离心至细胞碎片及 Chelex 沉降到 PCR 管底部, 同时上清液基本澄清, 此时细菌遗传物质溶解在上清液中。
- 6) 加入 1 μ l 上清液至配制好的 PCR 体系中, 特异性扩增细菌 DNA 中的 16S rRNA 基因, PCR 扩增程序如表 1 所示。

表 1. 细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增程序

温度	时长	目的
94 °C	4 min	预变性
94 °C	1 min	变性
56 °C	30 s	退火
72 °C	1 min 30 s	延伸
循环 32 次		
72 °C	10 min	延伸
4 °C	∞	保存

- 7) 扩增完成后取 5 μ l PCR 产物进行 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 若在 1500 bp 处有一条集中、明亮的条带, 则可将产物送至生物公司测序。若无条带, 则需重新进行 DNA 提取及 PCR 扩增。测序结果在 EzBioCloud 数据库 (Yoon *et al.*, 2017) 上进行比对, 可得到最相似菌株, 并根据此结果展开后续实验。

11. 后续实验参考:

- 1) 菌株保藏, 扩充微生物资源库。
- 2) 特定功能菌株筛选, 如纤维素降解功能等。
- 3) 新分类单元的多相分类实验, 当菌株与现有物种的相似性小于 98.7% (Chun *et*

al., 2018) 时, 可进一步开展分类学实验 (Li *et al.*, 2019)

4) 特定类群的代谢产物分析, 如放线菌产抗生素研究等。

结果与分析

1. 分离效果的评估:
 - 1) 总分离菌株的数量和多样性
 - 2) 潜在新分类单元的数量及多样性
2. 不同样点和培养基间分离效果的比较:
 - 1) α 多样性指数
 - 2) 绘制菌株类群堆积柱形图
3. 与同一样品的免培养结果比较。

失败经验

1. 所有无菌操作都需在超净工作台中进行, 并且提前灭菌的物品不宜在外放置过久。
2. 在分装 chelex 溶液至 PCR 管前, 先将 chelex 溶液充分摇匀, 确保每管中都有足量 chelex 珠; 并且挑取菌体时, 一定要将菌体充分搅拌混匀至 chelex 溶液中。
3. 当检测产物无条带时, 可能原因是 chelex 溶液变质, 需要重新配置 chelex 溶液。
4. 分离培养皿的编号至少需要包含样点、培养基和稀释梯度信息, 建议将每种水平用不同的数字/字母表示, 以简化编号。

溶液配方

1. 50 mg/ml 制霉菌素:

50 mg 的制霉菌素溶于 50 ml 二甲基亚砜中, 并在超净工作台用 0.22 μ m 的无菌滤膜过滤除菌, 配制完成后 4 °C 冰箱中保存备用。
2. 10% Chelex:

将 10 g Chelex 溶于 100 ml TAE 缓冲液中, 121 °C 高压灭菌 25 min, 放入 4 °C 冰箱中保存备用。
3. PCR 反应体系:

PCR MIX – 25 μ l

ddH₂O – 22 µl

PA – 1 µl

PB – 1 µl

模板 DNA – 1 µl

4. 1/10 R2A':

R2A Broth – 0.315 g

琼脂粉 – 18 g

海盐 – 20 g

ddH₂O – 1000 ml

pH 7.2 ± 0.2

121 °C 高压灭菌 30 min

5. 1/20 MA

Marine Broth 2216 – 1.87 g

琼脂粉 – 18 g

ddH₂O – 1000 ml

pH 7.6 ± 0.2

121 °C 高压灭菌 30 min

致谢

感谢中国博士后科学基金 (2020M683029; 2018M643294) 和广东省自然科学基金 (2020A1515011139) 资助此项工作。

参考文献

1. 沈德新, 封志纯, 杜江. (2004). [细菌 DNA 提取方法比较](#). *中原医刊* (10): 20-22.
2. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017). [Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies](#). *Int J Syst Evol Microbiol* 67(5): 1613-1617.
3. Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X. W., De Meyer, S. and Trujillo, M. E. (2018). [Proposed](#)

[minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes.](#)

Int J Syst Evol Microbiol 68(1): 461-466.

4. Li, X., Salam, N., Li, J. L., Chen, Y. M., Yang, Z. W., Han, M. X., Mou, X., Xiao, M. and Li, W. J. cc). [Aestuariivirga litoralis gen. nov., sp. nov., a proteobacterium isolated from a water sample, and proposal of Aestuariivirgaceae fam. nov.](#) *Int J Syst Evol Microbiol* 69(2): 299-306.