

焦化废水处理系统中不同培养基分离的细菌种群多样性

陈 敏^{1,2} 赵立平^{2*}

(¹ 杭州师范学院生命科学学院 杭州 310012)

(² 上海交通大学生命科学技术学院 微生物分子生态学与基因组学实验室 上海 200240)

摘 要:以焦化废水处理系统的微生物群落为对象,对 3 种不同培养基(YPG、LB、WW)分离细菌的能力及分离物的种群多样性组成进行了比较研究。同一悬浮污泥样品在 YPG、LB 和 WW 培养基上的活菌计数结果分别为 1.6×10^6 CFU/mL、 7.0×10^5 CFU/mL 和 9.8×10^5 CFU/mL。从每种培养基 10^{-4} 稀释度平板上共分离 137 株分离物。将所有分离物扩增近全长的 16S rDNA 并用限制性内切酶 *Hin*Ⅰ 对 PCR 产物进行 ARDRA (Amplified rDNA restriction analysis) 多态性分析,共得到 14 种不同的操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU)。其中 YPG 培养基上的分离物显示了 8 种不同的 OTUs,而 WW 培养基和 LB 培养基分离物只分别显示了 6 种和 4 种 OTUs。YPG-OTU1 和 WW-OTU6 所包含的菌株分别占到总分离物的 30% 和 22.3%,为优势分离物。ERIC-PCR 基因组指纹图分析表明,前者的 34 株分离物共有 20 种不同的指纹图类型,而后的 25 株分离物只有 3 种。因此,就分离焦化废水处理系统中的细菌及对分离物进行种群多样性的研究而言,YPG 培养基比其他两种培养基更合适。

关键词:培养基,分离物,种群多样性,ARDRA,ERIC-PCR

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:1006-6179(2003)03-0366-06

近年来发展了许多不依赖纯培养的分子生物学的方法来研究未培养或不能培养的微生物^[1,2],已经形成一个新兴的学科分支——微生物分子生态学。但另一方面,对纯培养物的生理和遗传功能的研究仍是群落生态学不可缺少的组成部分^[3]。因此,建立一类把分离培养技术和分子生态手段相结合的方法,对检测具特定生态功能的细菌种群的多样性、研究微生物与环境之间的相互作用等具有重要的意义。Dalmastri 等人^[4]曾用纯培养的方法从玉米根部分离了大量菌株,然后用 ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis) 的方法从中鉴定出 83 株菌株属于 *Burkholderia cepacia*,进一步用 RAPD 指纹图分析技术来分析这些菌株的遗传多样性,发现 *B. cepacia* 属于种内变异相当大的一个种。这种基于 PCR 的技术已成功地应用于对各种不同环境中分离的细菌种群进行遗传多样性的研究上。

分批富集培养通常所用的高营养浓度将使低速生长的细菌不能与较高速率生长的细菌相竞争,结果往往是具最高生长速率的一个或少数种群占优势^[5]。本文以焦化废水处理系统的微生物群落为研究对象,通过涂平板分离结合分子分类学的手段,评估不同的培养基和培养方法对检测焦化废水中微生物种群多样性的影响,为发展适合生态学研究目

基金项目:国家高科技研究发展计划项目(SZ-03-01-04)*;863 计划项目(2001AA214131)

* 通讯作者。Tel 86-21-54743351;Fax 86-21-54743348;E-mail:lpzhao@mail.sjtu.edu.cn

作者简介:陈敏(1963-),女,浙江绍兴人,副教授,主要从事环境微生物的研究。

收稿日期:2002-08-12,修回日期:2002-10-12

的新方法和新思路奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样品

采自上海某焦化厂废水处理系统(A²/O法)好氧池的悬浮污泥。

1.2 培养基与试剂

LB培养基:酵母抽提物 0.5%,蛋白胨 1.0%,NaCl 1%,pH 7.0~7.5。

YPG培养基:酵母抽提物 0.2%,蛋白胨 0.1%,葡萄糖 0.2%,pH 7.0~7.5。

WW培养基:取该废水处理厂原废水,经离心去除粗颗粒和过滤除菌后加琼脂 1.2%,自然 pH。

PCR试剂、限制性内切酶等购自 Promega 公司。

1.3 细菌的分离和纯化

将悬浮污泥样品充分振荡,用磷酸盐缓冲液倍比稀释,制备 10^{-1} ~ 10^{-5} 的稀释样品。取 0.2 mL 各稀释度样品分别涂布于 YPG、LB 和 WW 培养基平板上,每个样品重复 3 皿。将平板倒置,在 20℃ 恒温培养箱内培养 2~4 周,每天进行平板菌落计数。

选择菌落数在 30~100 范围的稀释度平板,将所有单菌落分别转接划线在相同培养基平板上,分离纯化。

1.4 PCR 反应模板的简易制备

用牙签从平板上挑取单菌落少许,将菌悬于 20 μ L 无菌水中,封口膜封口,95℃ 水浴 10min,立即置于冰上,10 000 \times g 瞬时高速离心,直接取 2 μ L 上清液作为 PCR 反应模板。

1.5 16S rDNA 扩增

真细菌通用引物 P0(5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG)和 P6(5'-CTACGGCTACCTGTTACGA)用于分离物的 16S rDNA 扩增^[6]。25 μ L PCR 反应体系。反应条件:95℃ 1min 30s,95℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 4 min,5 个循环;95℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 4 min,5 个循环;95℃ 30s,50℃ 30s,72℃ 4 min,25 个循环;72℃ 10 min,60℃ 10 min。

1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物:点样量 2~4 μ L。

1.6 ARDRA 分析

取 5 μ L(约 1.5 μ g)的 16S rDNA 的 PCR 产物,分别加入 1 μ L *Hinf* I,2 μ L 相应的 Buffer 和 12 μ L 去离子水,使反应体系为 20 μ L。37℃ 恒温 3~4 h。酶切产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 ERIC-PCR

用 ERIC-PCR 对分离物进行基因组指纹图分析,具体方法参见文献 [7]。

2 结果和讨论

2.1 细菌的分离计数

随着培养时间的延长,各培养平板上出现的菌落数不断增加。在本研究使用的 20℃ 培养温度下,要达到菌落数的最大值,培养时间至少应在两周以上。如图 1 所示,在为期 15d 的培养过程中,3 种培养基上的菌落数呈现类似的增长趋势。第 0~3 天,菌落数增加

缓慢,第 3~6 天增长速率最快,第 12 天左右又趋缓慢,第 15 天时菌落数基本达到最大值。

在较低的培养温度下进行较长时间的培养,能抑制其中生长速率较快的细菌种群迅速占优势,因而增加了生长速率较慢的细菌种类被分离培养的可能性^[3,8]。此外,选择适当的稀释度也很重要。在低稀释度平板上,往往一些快速生长的细菌如芽孢杆菌类的菌落扩展成一片,导致无法对其他菌落进行计数和分离,这在 LB 培养基上尤其明显。

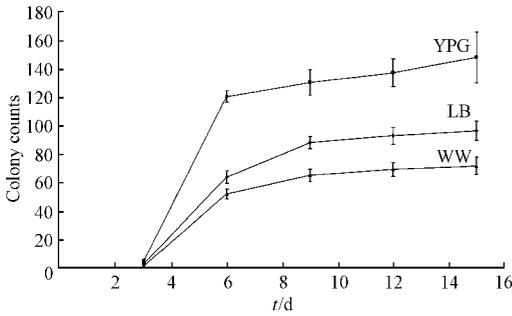


图 1 在 3 种培养基上菌落数随培养时间增长的趋势

Fig. 1 Effect of incubation time on the colony counts on YPG, WW and LB plates

平板计数的结果表明,不同的分离培养基上得到的菌落数有一定的差异(表 1)。据文献报道,大部分细菌不能在平板生长是因为它们适应于低营养浓度并且只能以较低生长速率生长。当土壤细菌涂布到不同稀释度营养肉汤培养基时,稀释 100 倍的营养肉汤上生长的细菌数要明显高于未稀释的培养基,并且发现许多细菌只能在经稀释后的培养基上被分离^[8]。故低营养浓度的培养基有时比丰富培养基可能产生更多的、更具代表性的细菌。

选择的 LB 培养基和 YPG 培养基,分别代表了丰富培养基和较低营养浓度的培养基,结果前者可培养的细菌数明显低于后者。至于废水(WW)培养基则是一类较特殊的选择性培养基,其中含有苯酚、氰化物等一般细菌难以利用甚至能抑制细菌生长的物质,只有具特殊降解功能的细菌才能在此培养基上生长。因此,能被分离培养的细菌明显较少。但就培养基本身来说,WW 培养基应该最接近被分离物的实际生长环境,所以重点将对其分离选择性进行考察。

选择的 LB 培养基和 YPG 培养基,分别代表了丰富培养基和较低营养浓度的培养基,结果前者可培养的细菌数明显低于后者。

表 1 不同培养基平板计数结果($\bar{x} \pm s$)

2.2 ARDRA 分析

Table 1 Plate counts on different isolation media ($\bar{x} \pm s$)

| Isolation medium | $\times 10^5$ CFU/mL |
|------------------|----------------------|
| YPG | 148 \pm 13 |
| LB | 96 \pm 6.7 |
| WW | 72 \pm 6.0 |

选取 10^{-4} 稀释度平板,挑取平板上所有单菌落分别划线分离纯化。从 YPG、WW 和 LB 3 种不同培养基平板上分别获得了 55、39 和 43 个分离物。将这 137 个分离物分别制备 PCR 简易模板扩增

16S rDNA,产生大约 1450bp 的扩增片段。用限制性内切酶 *Hinf* I 对 PCR 产物进行 ARDRA 多态性分析,可分成 14 种不同的 ARDRA 类型(图 2)。

据报道,ARDRA 的方法可在 16S rRNA 基因序列上区分细菌种(Species)的差异^[9];每一特有的 ARDRA 类型代表了一个操作分类单位(OTU)。用这种方法显示的 OTUs 多样性可用以估计分离物中存在的最低限度的细菌种的数目^[5]。因此,在本研究中,用 YPG、LB 和 WW 3 种不同培养基分离培养的菌株中至少应存在 14 种不同的细菌种群。其中 OTU1、OTU2 和 OTU6 在 3 种培养基分离物中有重叠外,其余不同的培养基各自存在特有的 OTUs,说明培养基不同,所分离的细菌种类有较显著的差异;而 OTU1、OTU2 和 OTU6 是分离物中数量占优势的 3 个主要细菌类群。就分离物的多样性而言,YPG 培养基最高,共显示 8 种 OTUs,其中特有的 OTUs 5 种;其次是 WW 培养基,有 6 种 OTUs,特有的 OTUs 4

种 ,LB 培养基最低 ,只有 4 种 OTUs ,特有的 OTUs 2 种。

在 14 种 OTUs 中 ,对分离菌株的分布情况进行了统计(图 2)。OTU1 所占比例最高 ,达总分离菌株的 39.8% ,其次是 OTU6 ,占 35.6%。

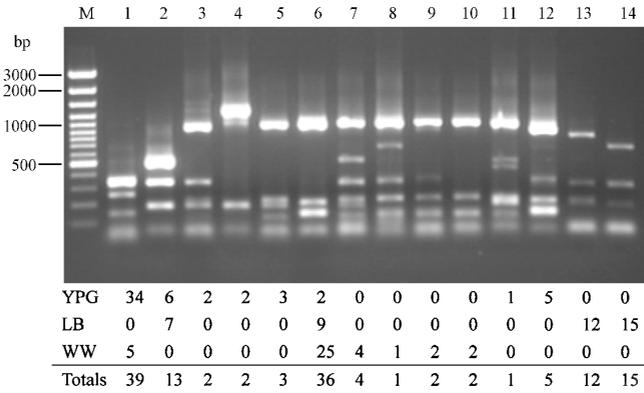


图 2 *Hin*Ⅰ 酶切 137 株分离物的 16S rDNA PCR 产物后的 ARDRA 类型

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of amplified 16S rDNAs digested with *Hin*Ⅰ from 137 bacteria isolated from wastewater sample

M :100bp DNA ladder ;Lane 1 ~ 14 :ARDRA patterns of strains isolated from YPG, LB and WW mediums.

The numbers of isolates for each ARDRA pattern are reported in the table below the gel.

2.3 种群多样性分析

用 ARDRA 的方法将分离物分成 14 个操作分类单元后 ,发现 YPG-OTU1(图 2 ,Lane 1)和 WW-OTU6(图 2 ,Lane 6)包括的菌株在数量上占优势 ,进一步通过 ERIC-PCR 指纹图的方法在菌株水平上分析其遗传多样性。结果前者的 34 株分离物共显示了 20 种不同的指纹图 ,种群多样性明显 ,而后者的 25 株分离物仅显示了 3 种不同的指纹图(图 3)。这一结果表明 ,OTU1 是一类多样性较丰富的种群 ,34 株分离物中存在 20 种不同的菌株 ,就分离培养污水中的细菌而言 ,YPG 培养基比其他两种培养基更适于用做非选择性培养基来达到分离计数和研究细菌多样性的目的。

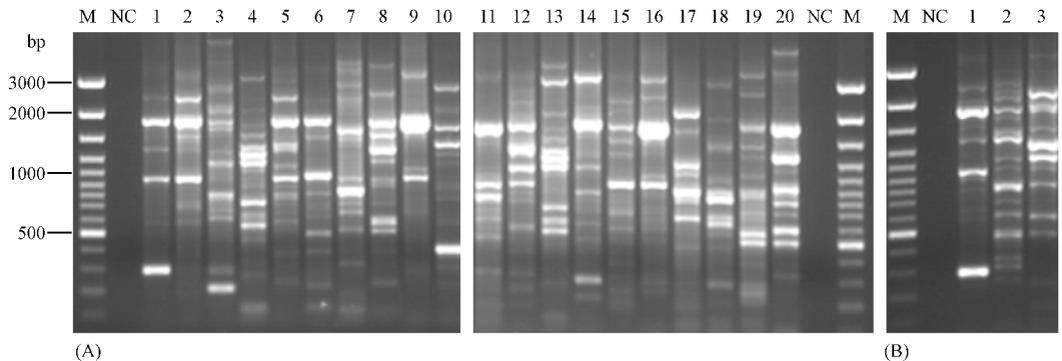


图 3 YPG-OTU1(A) and WW-OTU6(B)不同菌株 ERIC-PCR 指纹分析凝胶图

Fig.3 ERIC-PCR fingerprints of isolates from YPG-OTU1(A) and WW-OTU6(B)

M. 100bp DNA ladder ;NC. Negative control ;1 ~ 20(A). Unique ERIC-PCR patterns of strains obtained from YPG-OTU1 ;1 ~ 3(B). Unique ERIC-PCR patterns of strains obtained from WW-OTU6.

3 讨论

3.1 培养基与平板分离培养

用稀释涂布平板分离的方法,分离物的数量和多样性在很大程度上取决于所用培养基的营养组成和温度等培养条件。Uphoff 等人^[10]在研究海洋浮游微生物多样性时发现,用化能异养复合培养基能分离到较多的细菌和较高的系统发育多样性。相反,仅含一种碳源的培养基和化能自养型培养基所分离的细菌数目较低,得到几乎无一例外的都是 γ -Proteobacteria 类群的微生物。其原因是这类细菌能利用不同浓度的广谱碳源迅速生长,从而使它们在丰富培养基上数量占优势。相似的结果也在根际微生物的研究中存在^[11]。

本研究结果表明,YPG 培养基比 LB 和 WW 培养基能够更多地分离出焦化废水处理系统中各种不同类型的细菌,因而更有利于研究该系统的细菌的种群多样性。由于每种培养基都能够分离到在其他培养基上分离不到的独特类型的细菌,因此,研究细菌的多样性应该选择设计多种类似于 YPG 的培养基联合使用,才可能获得尽可能全面的细菌多样性的分析资料。

3.2 基于 PCR 的生物多样性的鉴定方法

目前已有许多研究表明,ARDRA 的方法可在 16S rRNA 基因序列水平上区分细菌种的差异^[9],如果再结合 ERIC-PCR 或 RAPD 等遗传指纹图的方法,这种技术便可用于鉴定和分析一个自然种群中细菌菌株的多样性^[12]。ERIC 序列(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence)是首先在肠道细菌基因组中发现的长为 126bp 的非编码保守重复序列^[6],在不同细菌中的拷贝数和定位都不同。利用 ERIC 保守序列设计的引物对细菌 DNA 进行 PCR 扩增,可以得到反映细菌基因组结构特征的谱带,由此可在亚种和菌株水平鉴定细菌^[7]。

用 ARDRA 区分不同的 16S rDNA 片段的精确性有赖于所选用的限制性内切酶的种类和数量。Mario^[9]等人曾用 ARDRA 研究了快速鉴别 Comamonadaceae 细菌的方法。首先,用 *Hin*II 限制性内切酶能鉴别被试细菌 13 个种中的 9 个种,剩余的 4 个种需再用 *Cfo*I 做酶切才能加以鉴别。本研究用 *Hin*II 对分离菌株的 16S rDNA PCR 产物进行 ARDRA 多态性分析,结果分成了 14 个 OTUs,在此基础上又用 *Hae*III 进一步做酶切分析,其结果与 *Hin*II 分析的相同(数据从略)。如果选择其他酶,不排除可能会细分出更多的 OTU 的可能性。至于分离物 14 个 OTUs 之间的系统发育关系以及各自分类地位的鉴定等,都有待于后续的研究工作来完成。

参 考 文 献

- [1] Amann R, Ludwig W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol Rev*, 2000 **24**: 555 ~ 565.
- [2] Gray N D, Head I M. Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacterial. *Environ Microbiol*, 2001, **3**: 481 ~ 492.
- [3] Jaspers E, Nauhaus K, Cypionka H. *et al.* Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001 **36**: 153 ~ 164.
- [4] Tabacchioni S, Chiarini A. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microbial Ecol*, 2000 **40**: 169 ~ 176.

- [5] Dunbar J , White S , Forney L. Genetic diversity through the looking glass : effect of enrichment bias . *Appl Environ Microbiol* , 1997 **63** :1326 ~ 1331 .
- [6] Per W , Ann-Christin A , Mats F. Biomonitoring complex microbial communities using random amplified polymorphic DNA and principal component analysis . *FEMS Microbiology Ecology* , 1999 **28** ,131 ~ 139 .
- [7] 赵立平 , 肖 虹 , 李艳琴 , 等 . ERIC-PCR : 一种快速鉴别环境细菌菌株的方法 . 应用与环境生物学报 , 1999 **5** 30 ~ 33 .
- [8] Peter H J , Penelope S Y , Bronwyn E G , *et al.* Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria* , *Actinobacteria* , *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia* . *Appl Environ Microbiol* , 2002 , **68** 2391 ~ 2396 .
- [9] Vaneechoutte M , Rossau R , Vos P D , *et al.* Rapid identification of bacteria of the comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA) . *FEMS Microbiology Letters* , 1992 **93** 227 ~ 234 .
- [10] Uphoff H U , Felske A , Fehr W , *et al.* The microbial diversity in picoplankton enrichment culture : a molecular screening of marine isolates . *FEMS Microbiology Ecology* , 2001 **35** 249 ~ 258 .
- [11] Jeffrey S B. A soil and rhizosphere microorganism isolation and enumeration medium that inhibits *Bacillus mycoides* . *Appl Environ Microbiol* , 1995 **61** :1839 ~ 1842 .
- [12] Cello F D , Bevivino A , Chiarini L , *et al.* Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages . *Appl Environ Microbiol* , 1997 **63** 4485 ~ 4493 .

Biodiversity of Bacterial Isolates on Three Different Media from Coking Wastewater Treatment System

Chen Min^{1 2} Zhao Liping*

(¹ School of Life Sciences , Hangzhou Normal College , Hangzhou 310012 , China)

(² School of Life Sciences and Biotechnology , Shanghai Jiao Tong University , Shanghai 200240 , China)

Abstract : Bacteria from coking wastewater treatment sludge samples were directly plated on three different isolation media (YPG, LB and WW) and the biodiversity of isolates was examined with DNA fingerprinting. Plate counts with YPG, LB and WW media were 1.6×10^6 CFU/mL, 7.0×10^5 CFU/mL and 9.8×10^5 CFU/mL respectively. 137 single colony isolates were obtained from these three media. ARDRA with enzymes *HinfI* revealed 14 operational taxonomic units (OUT) which were dominated by YPG-OTU1 group accounting for 34 isolates and WW-OTU6 group for 25 isolates. The biodiversity of isolates from these two dominant OUT groups was further investigated by a genomic fingerprinting technique , ERIC-PCR. The results indicated that there were 20 different ERIC-PCR types present among the YPG-OTU1 group and only 3 among the WW-OTU6 group. The data showed that the populations of bacteria isolated on three different media were significantly different from each other and a higher degree of genetic diversity was observed among strains isolated from YPG media. So YPG may be recommended to be used for a non-selective medium for isolating more diversified bacteria from wastewater bio-treatment systems.

Key words : Medium , Isolate , Population diversity , ARDRA , ERIC-PCR