

近自然纯培养法对细菌培养的初步研究

叶姜瑜^{1,2} 罗固源^{1,2} 王图锦³ 陈宏玲³ 谢 辉²

(重庆大学¹ 三峡库区生态环境教育部重点实验室 ² 城市建设与环境工程学院 重庆 400045)

(³ 西南大学生命科学学院 重庆 400715)

摘 要: 依据微生物在自然生境中协作生长的基本特性,提出一种对传统纯培养技术的改进思路及方法:设计一种有孔培养皿,皿内覆盖有不允许细菌通过、但营养物质可以自由流动的微孔滤膜。培养时将该培养皿放入被分离微生物所需生境中,可以克服传统纯培养难以提供外源活性物质的缺陷,一定程度上弥补了混合培养法和传统纯培养法的弱点,从而达到增强部分微生物可培养性、甚至培养出未培养微生物的目的。

关键词: 近自然纯培养法,可培养性,未培养微生物

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2005)05-0802-03

传统纯培养技术一直是微生物学研究的基石,但许多微生物在营养培养基中可培养性太低、不能被分离纯化的缺陷也严重地制约了对微生物多样性的深入研究^[1,2]。模拟自然(Simulated natural environment)培养策略是一种着眼于尽量提供微生物原生态环境和生态关系的培养思路,在一定程度上弥补了自然培养和传统纯培养的部分弱点,如采用悬浮滤膜技术(Floating-filter technique)可有效地增强嗜酸、铁氧化菌株的可培养性^[3],Kaeberlein 等(2002 年)设计的扩散生长盒(Diffusion growth chamber)可培养出的菌落数高于对照组 300 倍左右,还分离到两种以前认为是不可培养的微生物^[4]。根据模拟自然培养思路,我们提出一种近自然纯培养法(Near-natural pure culture technique)^[5],主要特征为将常规培养器皿进行钻孔改造,内衬一层允许活性物质流动、阻止细菌自由进出的微孔滤膜,培养时可放入细菌所需生境或模拟生境,也可在常规微生物实验室进行实验和应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本收集: 2003 年 10 月至 2004 年 11 月期间进行样本采集及实验,样本 Farm soil 取自重庆北碚农田土壤, Hill soil 取自西南大学大操场旁山坡土壤, Spring water 为重庆北温泉公园泉水, River water 为嘉陵江北碚段江水, Pond water 取自西南大学鱼塘 1 号池, Municipal sewage 取自西南大学居民区下水道生活污水, Anoxic wastewater 和 Aerobic wastewater 则分别取自重庆大学螺旋升流式污水反应器(Spiral Up-Flow Reactor)系统缺氧池和好氧池。

1.1.2 培养基: 营养琼脂培养基和蒙金娜基础培养基的配方及操作同文献[6]。纯琼脂培养基为琼脂 20g,蒸馏水 1000mL,自然 pH 值。

1.1.3 主要试剂: 微孔滤膜 A(亚美滤膜有限公司),微孔滤

膜 K(上海亚东核级树脂有限公司) $0.45\mu\text{m} \times 150\text{mm}$ $0.22\mu\text{m} \times 150\text{mm}$ 。其它化学试剂为国产分析纯。

1.2 荧光显微镜计数法

实验操作见文献[6]。

1.3 近自然纯培养法^[5]

在玻璃培养皿底部钻取 5mm 圆孔 5~6 个,形成有孔培养皿,将微孔滤膜覆盖于有孔培养皿上,轻轻抹动使滤膜同周围皿部较紧密相贴,无明显缝隙,滤膜外扣包住培养皿外沿,形成滤膜有孔培养皿。然后蒸汽高压灭菌,加入无菌培养基备用(图 1)。若无法将玻璃皿底部钻孔,则采用塑料培养皿(90mm)并将底部钻取 5mm 圆孔 5~6 个,选用同样大小玻

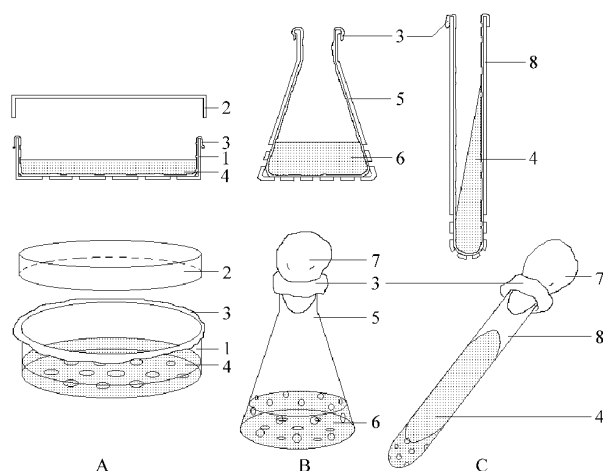


图 1 微孔滤膜近自然纯培养法装置图

Fig.1 Setting drawing of near-natural pure culture technique

A: Millipore filter dish; B: Millipore filter flask; C: Millipore filter tube.

1. Hole petre dish; 2. Cover; 3. Millipore filter; 4. Solid medium; 5.

Hole flask; 6. Liquid medium; 7. Cotton plug; 8. Hole tube.

基金项目 国家自然科学基金(50378095)/重庆大学骨干教师基金(716411045)

作者简介 叶姜瑜(1963-)男,四川省青川县人,副教授,在职博士研究生,主要从事微生物生态学及环境微生物学研究。Tel: 86-23-68252137; E-mail: yejy@swnu.edu.cn

收稿日期 2005-01-21,修回日期 2005-04-25

璃培养皿的血盖与之相配。将微孔滤膜和血盖进行蒸汽高压灭菌后,在超净工作台内用无菌镊将微孔滤膜覆盖于塑料有孔培养皿上,并用无菌玻棒抹动膜使之较紧密与皿壁相贴,滤膜外扣包住培养皿外沿,加入无菌培养基后,盖上无菌血盖待用。无菌条件下接种欲分离微生物,方法同常规微生物分离法。将该培养皿放入一个盛有原生环境物质的外皿中进行培养,外皿中液面应不高于内部培养基表面以免形成

明显水渍影响菌落形成。

2 结果和分析

在其它条件相同情况下,以近自然纯培养法和传统纯培养法对不同样本进行细菌培养,在多种稀释度下选取一适宜稀释度,仅对细菌 CFU(Colony forming units)进行计数和观察,其结果见表 1 和图 2。

表 1 两种培养法对不同样本的培养结果

Samples	Conventional culture method			Near-natural pure culture method			Microscopy direct count	CFU ratio *
	CUF(mL or g)	No. of isolates	Culturability /%	CUF(mL or g)	No. of isolates	Culturability /%		
Farm soil ^a	3.67 × 10 ⁶	23	0.35	4.17 × 10 ⁶	28	0.40	1.04 × 10 ⁹	1.14
Farm soil ^b	2.17 × 10 ³	3	0.00	1.67 × 10 ⁵	12	0.02	1.04 × 10 ⁹	76.96
Hill soil ^a	8.00 × 10 ⁶	18	—	5.83 × 10 ⁶	21	—	—	0.70
Spring water ^d	8.33	2	0.11	4.33 × 10	6	0.58	7.46 × 10 ³	5.20
River water ^d	3.50 × 10 ⁴	11	0.42	9.33 × 10 ⁴	15	1.13	8.28 × 10 ⁶	2.67
Pond water ^a	8.33 × 10 ⁴	4	—	3.67 × 10 ⁵	6	—	—	4.41
Pond water ^b	4.00	1	—	1.28 × 10 ²	4	—	—	32.00
Municipal sewage ^a	2.50 × 10 ⁶	15	—	5.17 × 10 ⁶	18	—	—	2.07
Municipal sewage ^b	3.33 × 10	2	—	8.67 × 10 ²	6	—	—	26.04
Anoxic wastewater ^a	2.33 × 10 ⁶	12	1.32	2.17 × 10 ⁶	13	1.23	1.76 × 10 ⁸	0.93
Anoxic wastewater ^c	9.50 × 10 ⁵	5	0.54	8.33 × 10 ⁵	7	0.47	1.76 × 10 ⁸	0.88
Aerobic wastewater ^a	8.67 × 10 ⁵	12	1.14	1.17 × 10 ⁶	16	1.54	7.58 × 10 ⁷	1.35
Aerobic wastewater ^c	4.33 × 10 ⁵	3	0.57	7.83 × 10 ⁵	5	1.03	7.58 × 10 ⁷	1.81

^a Nutrient agar medium , 37℃ , 4d incubation ; ^b Pure agar medium , 37℃ , 7d incubation ; ^c Менкина basal medium , 30℃ , 4d incubation ; ^d Agar medium of 100-fold nutrient dilution , 37℃ , 7d incubation. * CFU ratio is the colony numbers of Near-natural pure culture method to Conventional culture method.

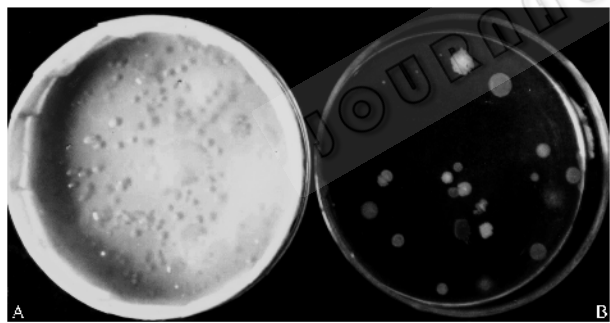


图 2 不同培养法对微生物的可培养性比较(市政污水 , 10⁻⁴ 培养 4d)

Fig.2 The comparison of different culture method(Municipal sewage , 10⁻⁴ , 4d)
A : Near-natural pure culture method ; B : Conventional culture method.

从表 1 中可见,在所选择稀释度和培养情况下,大多数适宜计数和观察的培养皿中,近自然纯培养法比传统培养法的平皿中出现的菌落数要多,其二者的菌落数比率(CFU ratio)多数大于 1,这表明近自然纯培养法在一定程度上有增强部分微生物可培养性的作用。在用纯琼脂培养基培养农田土壤时,其二者的菌落数比率高达 76.96 倍。虽然此结果明显同培养基的选择有关,因为纯琼脂培养基不能为农田土样的培养提供任何营养基质,但也说明近自然纯培养法的确为被培养细菌提供了部分原生境的营养和活性物质。

其次,从表 1 的分离物数(No. of isolates)一项可以看出,即使同样情况下近自然纯培养法获得的总菌落数低于对照组(即菌落数比率小于 1),其菌落种类数却仍然高于其传统培养法的对照组,这种结果在对 Hill soil^a 和 Anoxic wastewater 样本的培养中可以看到。这种结果很可能同培养基营养成分、样本中细菌种群组成都有关系,如用营养琼脂对山坡土样的近自然纯培养中,由于培养基中营养物通过微孔滤膜的部分流失造成了皿内营养浓度低于传统培养法,从而使土样中需要高营养物质的快速生长细菌群生长受到影响,造成某些菌株生长更弱和菌落总数减少;Anoxic wastewater 样本本身取自污水生物处理反应器的缺氧池中,完全暴露于空气中的近自然纯培养法很可能不会使样本中某些厌氧和兼性厌氧的优势菌群获得更有利的生长机会,从而造成菌落数目低于对照。

在对同一分离样本的几种稀释度进行统计时发现,即使两种培养法获得的菌株总数趋于一致,但其菌株类型仍然有一定的差异。这种结果表明,无论近自然纯培养法有无其它价值和优势,它对传统培养法都是一个有力的补充,很可能利用它可以分离到一些传统培养法尚未分离出的菌株和种类。而对那些分离物数目明显低于对照的培养,还需要对其原因和结果进行深入分析和研究。

3 讨论

本因素取决于是否找到适宜的培养方法^[7]。有许多因素阻碍环境细菌在人工培养基上的复苏,而共同协作的自然生存方式的崩溃^[8]、生境的极度营养变化^[9]、活性物质和通讯的中断及生态位巨变等是细菌可培养性低的重要生态学原因^[10,11]。近自然纯培养法在一定程度上为被培养细菌提供了同原生境沟通的可能:物质流的交换,也可能有信号分子的交流,使得强烈依赖这种生态关系的部分细菌有可能被培养出来。另一方面,通过微孔滤膜的营养物泄漏也会造成某些快速生长菌株更弱或菌落数更少,但种类数目基本不减少,这说明近自然纯培养法在一定程度上是“雪中送炭”,而非“锦上添花”式的培养方式。也就是说,近自然纯培养法的相对技术优势在于它提供了同原生态沟通的可能性,这不一定能使已经长出的菌株生长得更好,但它给那些强烈依赖原生境中活性物质而不能在传统法培养基上形成菌落的菌株提供了生长的可能,即它有培养出未培养细菌的潜力。不过,由于实验方法的初步建立,此次实验中仅选择某一适宜计数的稀释度进行观察分析、未对二者进行总菌数和差异菌株的比较分析研究等,具有较强的主观性和较高的人为误差;其次,实验中我们也发现,外皿体积、营养泄漏率、培养基厚度、外皿水体的更换率等造成的系统误差是客观存在的,仍有待于进一步深入研究和分析。尽管如此,该方法仍可能有巨大潜力,即它可用于各种自然和人为的生境中,甚至活体植物、动物组织或个体。因此,它不是过去传统培养方法的重复或替代,而是对其它方法的一个补充。

参 考 文 献

- [1] Norman R P. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, **276**: 734 – 740.
- [2] 叶姜瑜, 罗国源. 未培养微生物的研究与微生物分子生态学的发展. *微生物学通报*, 2004, **31**(5): 111 – 115.
- [3] DeBruyn J C, Boogerd F C, Bos P, *et al.* Floating filters, a novel technique for isolation and enumeration of fastidious, acidophilic, iron-oxidizing, autotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 2891 – 2894.
- [4] Kaerberlein T, Lewis K, Epstein S S. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 2002, **296**: 1127 – 1129.
- [5] 中国专利申请. 一种增强微生物可培养性的微孔滤膜近自然培养法及其装置. 申请号 200410037037.8.
- [6] 陈绍铭, 郑福寿, 编著. 水生微生物学实验法(上). 第一版. 北京: 海洋出版社, 1985.
- [7] Bartscht K, Cypionka H, Overmann J. Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community. *FEMS Microbiol Ecol*, 1999, **28**: 249 – 259.
- [8] Dunbar J, White S, Forney L. Genetic diversity through the looking glass: effect of enrichment bias. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 1326 – 1331.
- [9] Schut F, de Vries E J, Gottschal J C, *et al.* Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 2150 – 2160.
- [10] Bruns A, Nübel U, Cypionka H, *et al.* Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 1980 – 1989.
- [11] 叶姜瑜, 罗国源. 微生物可培养性低的生态学释因与对策. *微生物学报*, 2005, **45**(3): 116 – 120.

Preliminary study on bacterial culture through near-natural pure culture technique

YE Jiang-yu^{1,2*} LUO Gu-yuan^{1,2} WANG Tu-jin³ CHEN Hong-ling³ XIE Hui²

(¹ Key Laboratory of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education,

² City Construction and Environmental Engineering Academy, Chongqing University, Chongqing 400045, China)

(³ School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Based on the ecological features of mutual benefits of different microbes in natural environment, near-natural pure culture technique which was an improvement of conventional pure culture method had been put forward. The key point of this new method was to make hole petri dishes covered with millipore membranes. When these covered dishes being used to culture microorganisms, it could provide incubated microbes active materials from native environment, maintain free communicating with outside microbes, and improve their recovery and culturability of some bacteria. To some degree, this technique enhanced their strengths and overcome their weaknesses of mixed culture method and conventional pure culture method so as to increase microbial culturability and even possibly obtain some nonculturable microorganisms.

Key words: Near-natural pure culture technique, Culturability, Nonculturable microorganism

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(50378095); Key Teacher Foundation of Chongqing University(716411045)

* Corresponding author. Tel: 86-23-68252137; E-mail: yejy@swnu.edu.cn

Received date: 2005-01-21