

不同培养基组合提高土壤细菌可培养性的研究

胡元森^{1,2} 李翠香¹ 孙富林² 吴 坤² 贾新成^{2*}

(¹河南工业大学生物工程学院 郑州 450052)

(²河南农业大学生命科学学院 郑州 450002)

摘 要:为选择性采用多培养基组合以提高土壤细菌可培养性,利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术研究了贫营养、富营养和自然营养培养基在 3 种培养方式下获得细菌种群的差异。结果表明:平板培养条件下,细菌在贫营养培养基上生长较慢,菌落连续稳定形成。培养 5d 后,富营养的 LB 培养基和贫营养的 R2A 培养基获得菌落数最多,分别是贫营养的 0.1×LB 培养基获得菌落数的 5.1 倍和 5.3 倍。7 种培养基中, LB 培养基获得细菌种群数目最多,营养成分适当稀释后,培养物中有新的种群出现。贫营养培养基和富营养培养基培养物 DGGE 图谱相似性低,条带互补性强。三角瓶静置培养时, R2A 和 LB 培养基获得细菌种群数目较多,其它几种培养基获得的细菌类群都能在这 2 种培养基中找到。试管静置培养条件下, LB 培养基获得细菌种群数目最多,某些种群也只出现在 R2A 培养基和 TSB 培养基上, R2A 及 LB 培养基与 TSB 培养基获得的细菌种群差异较为明显。研究结果为特殊培养基设计及选用合适培养基分离土壤细菌提供参考。

关键词:细菌;可培养性;培养基;变性梯度凝胶电泳

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)05-0882-06

纯培养技术被频繁和常规地用于微生物的分离、纯化、培养计数,一直是微生物学研究的基石^[1]。然而,越来越多的研究表明,自然环境中绝大多数微生物还无法通过纯培养的方法获得。目前,能够确定培养方法,实现人为增殖和利用的微生物不超过 1%^[2]。纯培养技术的局限性已成为微生物资源开发和环境生态研究的主要瓶颈。

为避开传统培养方法的固有缺陷,研究者利用分子生物学技术和手段,从环境中获得了大量有用信息,克隆到了许多新的基因^[3,4]。这一方法极大地推动了自然界功能微生物资源的开发和利用,但仍然没有克服微生物不可培养所导致的根本弊端。因为这些方法不以获取微生物活体细胞为目的,对它们的形态、生理特性、代谢功能、对环境的影响等难以进行实验研究,严重阻碍了对微生物生命活动规律的探索,进而影响对微生物工艺进行准确设计、精细调控和高效利用^[5]。

近年来,研究和开发未培养微生物已成为国内外的一个热点。许多学者通过改变培养基营养、配方以及改进细胞培养方式^[6],从环境中分离得到多个新的微生物种群。如 Janssen 等^[7]研究发现,适当

降低培养基营养成分,可提高土壤中变形杆菌、放线菌、嗜酸性细菌的可培养性。Connon 等^[8]采用高通量培养法对贫营养细菌进行培养和计数,使微生物可培养性较常规培养法高出 1.4~120 倍,并从海水分离到多株未培养的浮游细菌。岳秀娟等^[9]在培养基中加入甜菜碱、丙酮酸钠或过氧化氢酶等化合物,从土壤中分离得到的微生物种类及菌落总数也明显增加。这些基于可培养层面上的发现也潜在地拓宽微生物资源的利用空间,为获取新的有用代谢产物奠定基础。

本文对贫营养、富营养及原生态土壤浸出液等培养基在不同培养方式下获得的培养物进行分析,为深入了解这些选择性培养基对不同微生物的培养能力,充分利用各培养基的特殊作用,从而为特殊培养基的设计及多培养基组合提高环境微生物的可培养性提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品:2005 年 11 月于郑州市郊弓寨村附近麦田中取小麦若干株,将其根部土壤轻轻抖落

基金项目:河南工业大学博士基金项目资助(150206);河南省教育厅科技攻关项目资助(200510466021)

* 通讯作者。Tel:86-371-63555915 E-mail:jxch43@163.com

作者简介:胡元森(1976-)男,河南光山县人,博士,讲师,研究方向为土壤微生物。E-mail:hys308@126.com

收稿日期:2007-01-15;接受日期:2007-04-13;修回日期:2007-06-30

下来,装入无菌纸袋,带回实验室后研磨过 1mm 筛,置 4℃ 冰箱保存备用。

1.1.2 培养基:本试验所用 7 种培养基分别是 LB、0.25 × LB、0.1 × LB、TSB、0.25 × TSB、R2A、土壤浸出液培养基。根据营养物浓度高低,可认为 LB 和 TSB 培养基是富营养培养基,0.1 × LB 和 R2A 为贫营养培养基,0.25 × LB 和 0.25 × TSB 为中度营养培养基,而土壤浸出液培养基为自然态营养培养基。TSB 培养基配制参见文献^[10]。R2A 培养基和土壤浸出液培养基配制参见文献^[11,12]。

1.1.3 主要试剂:Tryptone Powder、Yeast extract 及琼脂糖(BBI 公司)、蛋白酶 K(Merck 公司)、SDS 及 CTAB(Amresco 公司)、dNTP(上海生工生物工程有限公司)、Taq 酶(宝信生物科技有限公司)。

1.2 培养方法

1.2.1 土壤悬液制备:取备用土样 10g 置于预先装有玻璃珠和 90mL 无菌水的三角瓶中,室温 150r/min 振荡 30min,然后取 1mL 土壤悬液用无菌水进行梯度稀释,获得 10^{-1} ~ 10^{-7} 稀释度的土壤悬液。

1.2.2 平板培养:多次预备实验后,选取 10^{-6} 和 10^{-7} 2 个最佳稀释度的土壤悬液各 0.2mL 分别涂布在上述 7 种培养基平板上,每个稀释度 3 个重复。平板涂布后置于 25℃ 培养 5d,每天定时统计平板菌落数目。计数结束后用刮铲及无菌水将各培养基表面菌落洗涤下来,离心后得到各培养基平板培养物。

1.2.3 液体静置培养:分别取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 3 个稀释度的菌悬液各 0.1mL 接种于装 100mL 上述 7 种液体培养基的三角瓶(250mL 容量)中,25℃ 静置培养 64h,每个稀释度 3 个重复。培养结束后离心收集同种培养基获得的培养物。

1.2.4 液体试管静置培养:分别取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 3 个稀释度的菌悬液各 0.1mL 接种于装有上述 7 种液体培养基的试管(30cm × 2.5cm)中,培养基液面距试管口约 1 cm,用不透气塑料塞塞住试管口。接种后置于 25℃ 静置培养 72h,每隔 24h 颠倒试管几次以混匀其中培养物,每个稀释度 3 个重复。培养结束后离心收集同种培养基获得的菌体。

1.3 DNA 提取

1.3.1 可培养物基因组 DNA 的提取:将平板培养、三角瓶静置培养及试管静置培养获得的菌体转移至 50mL 离心管中,加入 7.5mL DNA 提取液(0.1mol/L Tris-HCl pH8.0,0.1mol/L EDTA pH8.0,0.1mol/L 磷酸盐缓冲液,1.5mol/L NaCl)和 100 μ L 蛋白酶 K(10mg/L),37℃ 225r/min 振荡 30min,然后加入 0.75mL 20% SDS,置于 65℃ 水浴 1h(每隔 15 ~ 20min

轻摇一下)。用 8000 × g 离心 10min 取上清,再往沉淀中加 4.5mL DNA 提取液和 0.5mL 20% SDS 后于 65℃ 水浴 10min,再用 8000 × g 离心 10min 取上清液。2 次上清液合并后加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)离心 10min,取水层并加入 0.6 体积异戊醇,静置沉淀 1h 后于 8000 × g 离心 10min,去上清后往沉淀中加入预冷的 70% 乙醇洗涤 1 次,在 8000 × g 离心 10min 后去上清液,DNA 沉淀加 50 ~ 100 μ L 超纯水后转移至小管中。

1.3.2 土壤中微生物总基因组 DNA 的提取及纯化:土壤微生物基因组 DNA 提取和定量参照文献^[13]报道的方法。DNA 粗提物采用 Vitagen 凝胶试剂盒纯化(product code: 110610-05 Vitagene Biotechnology Co., Ltd.)。

1.4 PCR 扩增

以纯化后的基因组 DNA 为模板,用对大多数细菌和古细菌 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物对 F341 和 R518 来进行扩增,为使扩增产物能在 DGGE 上更好地分离,一个 40bp 的 GC 夹子^[14]加在 F341 的 5' 端。PCR 采用 50 μ L 反应体系,PCR 反应参数 95℃ 预变性 4 min,94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 1min,35 个循环,72℃ 延伸 10min。

1.5 变性梯度凝胶电泳(DGGE)及其图谱相似性

DGGE 参数为:变性剂梯度为 35% 到 55% (100% 变性剂浓度为 7mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物),聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10%,点样量为 30 μ L PCR 产物。电泳温度 65℃,电压 150V,电泳时间 5.5h。电泳结束后在 SYBR Green I DNA 染色液中染色 20min。将染色后的凝胶用 Biocampt 成像系统拍照,并用软件 NTSYSpc 比较电泳条带的迁移率及条带数量,并据此对图谱各泳道作相似性分析。

2 结果

2.1 平板培养物数量分析

从表 1 看出,培养 5d 后,0.1 × LB 培养基上细菌菌落最少,平均每 g 土壤获得 1.3×10^7 个 CFU (colony-forming unit)。LB 富营养培养基和 R2A 贫营养培养基获得菌落数最多,都达到 6.67×10^7 CFU 以上,分别为 0.1 × LB 获得 CFU 数的 5.13 倍和 5.33 倍。LB 和 TSB 培养基营养成分稀释后,其 CFU 数明显减少,如 0.25 × LB 和 0.25 × TSB 培养基获得 CFU 数分别占 LB 和 TSB 培养基 CFU 数的 54.7% 和 88.1%。

表 1 显示,富营养的 LB 和 TSB 培养基上菌落生

长速度较快,CFU 数在第 3 天几乎达到最大。贫营养培养基如 R2A、0.1 × LB 和土壤浸出液培养基上

菌落形成速度慢,菌落连续稳定形成,在第 5 天才达到最大值。

表 1 各培养基平板菌落计数

Table 1 Plate counts of bacteria using different media

t/d	Media (× 10 ⁶ CFU/g dry soil)						
	R2A	Soil extraction	LB	0.25 × LB	0.1 × LB	TSB	0.25 × TSB
1	20.7 ± 1.2	18.5 ± 1.3	38.3 ± 2.5	15.5 ± 1.3	4.7 ± 1.2	28.5 ± 2.2	10.3 ± 1.5
2	34.3 ± 3.2	25.6 ± 2.3	51.5 ± 3.1	19.3 ± 1.5	7.3 ± 1.2	30.7 ± 2.1	15.6 ± 1.2
3	54.7 ± 2.3	30.3 ± 2.5	63.3 ± 2.5	28.4 ± 2.4	8.5 ± 0.5	33.4 ± 2.1	21.3 ± 1.5
4	66.5 ± 3.5	32.5 ± 2.8	65.0 ± 3.6	34.3 ± 1.2	12.7 ± 1.5	35.7 ± 1.5	30.5 ± 1.8
5	69.3 ± 3.8	34.3 ± 3.1	66.7 ± 3.5	36.5 ± 1.3	13.0 ± 1.0	36.0 ± 2.0	31.7 ± 2.3

2.2 平板培养物 DGGE 分析

图 1 显示,土壤样品和各培养物经 DGGE 分离后得到 48 条迁移率不同的条带。其中,土壤样品获得 36 个条带,远较可培养物所得条带数目多,且条带均匀分布在不同浓度变性剂范围内。不同培养基获得培养物差异也较大,由 LB 培养基获得条带数最多,占总条带数的 60.4%,而 0.1 × LB 培养基获得条带数最少,只有 20 条,其中 18 条与 LB 培养基所得条带相同。LB 和 TSB 培养基营养成分稀释前后获得的条带数目及迁移率相差不大,泳道相似性较高。但同为贫营养培养基的 0.1 × LB、R2A 和土壤浸出液培养基,其图谱差异明显,条带互补性强,表

明不同的培养基组对可培养细菌具有一定选择性。

由图 1 看出,尽管图中条带数目较多,但只有 A1、A2 和 A3 3 个条带分布在各培养基所在泳道,占可培养物总条带数的 6.25%。某些条带只在少数泳道显现,如 B1 和 B2 只在 lane 1 和 lane 4 泳道出现,B3、B4 和 B7 只在 lane 1 和 lane 3 泳道出现,而 B5 和 B6 也只在 lane 1 和 lane 5 泳道显现(图 1,* 标记)表明 B1 ~ B7 代表的土壤细菌只能由特定培养基培养获得。此外,条带 C1 ~ C5 只在单一泳道出现,如 C2、C3 和 C5 只在土壤样品所在泳道出现,暗示这 3 个条带所代表的细菌种群用上述 7 种培养基都不能获得,而 C1 和 C4 代表的细菌种群也只能分别用土壤浸出液培养基和 R2A 培养基才可获得。

从图 1 泳道相似性来看,0.25 × LB 与 TSB 培养基条带相似性最高,达 87%。LB、TSB 及其稀释液培养物存在一定差异,可培养物的 DGGE 图谱具有 71% 的相似性。富营养的 LB 和 TSB 培养基与贫营养的 R2A 及土壤浸出液培养基条带差异明显,相似性仅为 54% 和 58%。各培养基所得条带与直接分析土壤样品所得结果差异大,相似性仅为 49%。相似性分析与前述培养物图谱分析结果相符。

2.3 三角瓶静置培养物 DGGE 分析

从图 2 可看出,三角瓶静置培养物经 DGGE 分析后获得 32 个条带。在 7 种培养基中,R2A 培养基获得条带数目最多,占条带总数的 84.37%,而同为贫营养的 0.1 × LB 培养基只获得 15 个条带,且这些条带均在 R2A、0.25 × LB 和 TSB 培养基泳道出现。

尽管 D1 ~ D5 共 5 个条带在各泳道的亮度不一,但都出现在各培养基泳道中。相反,图中部分条带只在特定泳道中显现,如 E2、E3 和 E5 仅在富营养的 LB 培养基泳道出现,E1、E4、E6、E7、E8 和 E9 仅在贫营养的 R2A 培养基泳道出现。其它几个泳道显现的条带也大多能在这 2 个泳道中找到。

0.1 × LB、TSB 和 0.25 × TSB 培养基所在泳道图谱差异不明显,NISYSpc 软件相似性分析显示三者

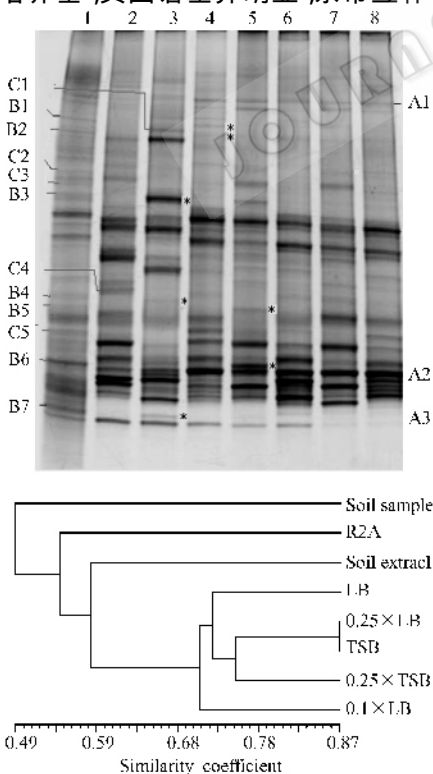


图 1 平板培养物的 DGGE 图谱及聚类分析

Fig.1 DGGE pattern and its cluster dendrogram of plate culture. L1 : Soil sample, L2 : R2A, L3 : Soil extraction, L4 : LB, L5 : 0.25 × LB, L6 : 0.1 × LB, L7 : TSB, L8 : 0.25 × TSB

相似性高达 78.2% 以上。此外, LB 与土壤浸出液培养基获得 DGGE 图谱的相似性也高达 80%, 但 LB、TSB 及其稀释液培养物与 R2A 培养物相差较大, 其泳带相似性仅有 50%。

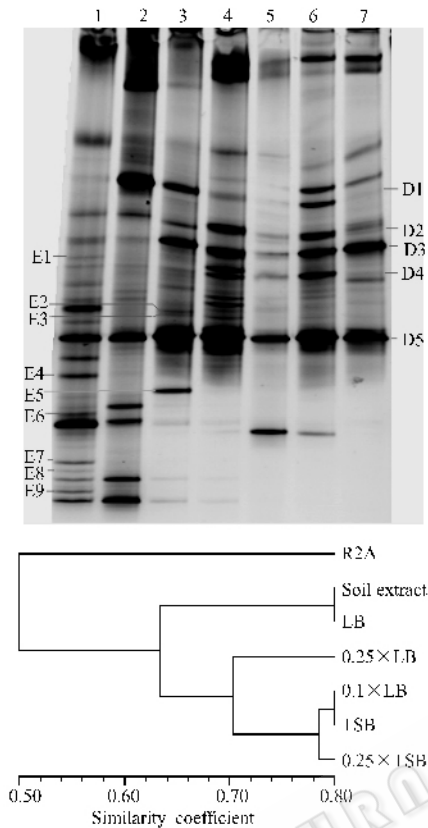


图2 三角瓶静置培养物的 DGGE 图谱及聚类分析

Fig.2 DGGE pattern and its cluster dendrogram of static flask culture. L1 :R2A, L2 :Soil extraction, L3 :LB, L4 :0.25 × LB, L5 :0.1 × LB, L6 :TSB, L7 :0.25 × TSB

2.4 试管静置培养物 DGGE 分析

图 3 显示各液体培养基在试管深层静置培养获得培养物的 DGGE 分析结果。由图 3 看出, 7 个泳道共有 35 个迁移率不同的条带, 各泳道条带数目及迁移率也不尽相同。其中, LB 培养基获得条带数最多, 0.25 × TSB 培养基获得条带数最少, 仅 12 条, 二者分别占总条带数的 80% 和 34.35%。从条带在胶片的分布上看, LB 和 TSB 获得的培养物分布于 35% 和 55% 变性剂范围内, 而其它五种培养基所得培养物 16S rDNA V3 区 T_m 值较低, 条带大多位于低浓度变性剂范围。

从图 3 发现, 有 5 个不同迁移率的条带分布各泳道中, 如 F1 ~ F5。而某些条带只在一两个泳道中出现, 如条带 G2 和 G3 只在贫营养的 R2A 和 0.1 × LB 培养基出现, G1 和 G4 也只出现在 R2A 培养基泳道中。在富营养的 LB 和 TSB 培养基泳道内也发现

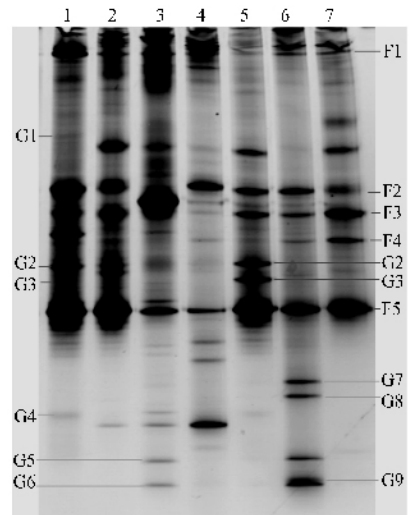


图3 试管静置培养物的 DGGE 图谱及聚类分析

Fig.3 DGGE pattern and its cluster dendrogram of static test tube culture. L1 :R2A, L2 :Soil extraction, L3 :LB, L4 :0.25 × LB, L5 :0.1 × LB, L6 :TSB, L7 :0.25 × TSB

特征性条带, 如条带 G5 ~ G9 (图 3 lane3, lane6)。

从泳道相似性看, R2A 与土壤浸出液培养基、0.25 × LB 与 0.25 × TSB 培养基获得图谱条带差异不大, 相似性都达到 80%。TSB 与 LB 培养基所得条带亮度与迁移率差别明显, 相似性只有 56%, 两泳道间条带互补性强。

3 讨论

一般认为, 自然环境中微生物数量庞大, 其可利用的营养物质极度匮乏, 多数处于“贫营养”状态, 且一些微生物适宜生长在与自然环境相近的基质中^[5]。因此, 用贫营养或辅以含少量生长因子的土壤浸提液制成的培养基则会获得较好的培养效果^[9]。这一推论在本试验中并未完全得到证实, 如 0.1 × LB 培养基和土壤浸出液培养基获得菌落数目比贫营养的 R2A 培养基和富营养的 LB 培养基都少。这一情形的出现可能与贫营养细菌的种群特性有关, 有报道认为生存于贫营养环境中的微生物尽管能够在低浓度营养条件下生长, 但是有些微生物

生长速度极为缓慢,在常规设定的培养周期内(例如1周)没有长成肉眼可见的菌落就被遗弃^[5]。此外,一些嗜贫营养的微生物在固体培养基表面呈迁徙生长和扩散生长,不会形成肉眼可见的菌落^[15]。实验发现,培养前2d,各培养基表面菌落快速形成,至第5天,CFU数目增加缓慢,这一情形暗示嗜贫营养细菌生长需较长的生长周期。因此,贫营养的 $0.1 \times$ LB培养基和土壤浸出液培养基CFU数目过少可能与一些嗜贫营养细菌生长特性及本实验培养时间过短有关。但应指出的是,本研究中贫营养的R2A培养基获得菌落数目又较其它培养基多,这可能与培养基组成成分有关,R2A培养基中含有丙酮酸钠成分。研究表明丙酮酸钠能降解培养过程中产生的毒性氧,对恢复微生物可培养性具有很好效果^[16]。上述结果提示人们,在培养获取至今未培养的微生物时,除考虑适当延长培养时间外,还可在培养过程中加入具有毒性氧降解能力的物质,例如过氧化氢酶、丙酮酸钠和 α -酮戊二酸等过氧化氢降解物和抗氧化剂如二硫代二丙酸等^[5]。

DGGE条带数目近似体现样品中优势菌群的数量,而条带亮度则反映该种细菌数量的多寡。据此看来,平板培养条件下, LB培养基获得细菌种群数目最多,而将其作4倍稀释,则培养物中有新的种群出现(图1, lane 5, * 标记),将其作10倍稀释时,其培养物中也有2个新的种群出现,这一结果证实自然生境中微生物的分布是随营养渐变而呈现的梯级分布^[1]。在不同的营养浓度下,微生物种群分布差异也较明显,因此,培养策略不应仅是全营养或100倍稀释的简单选择。

图1显示,某些条带只在特定泳道出现,这表明该条带代表的细菌只能用此种培养基培养获得,如条带B1和B2代表的土壤菌群只能用LB培养基培养获得,B4和B7代表的细菌只能用土壤浸出液培养基获得。C2、C3和C5共3个条带只在土壤样品所在泳道显现,暗示它们所代表的种群用上述7种培养基都不能获得。但图1中发现,某些培养基泳道出现的条带在土壤样品泳道并未表现出来,这可能是由于该条带代表的细菌在土壤中细胞数目较少,其DNA含量达不到DGGE检测限,遗传信息被土壤中其它数量较多的种群所掩盖而未被显现出来。此类群经富集培养后,细胞数目大幅增加,故在培养基泳道中其条带灰度较大。

在图1众多条带中,只有A1、A2和A3条带同时显现在各泳道中,占可培养物总条带数的6.25%。这表明3个条带所代表的土壤细菌种群对

营养需求不严,用7种培养基任一种均可培养得到,但这类细菌在自然环境中较为少见,所占比重很低。

图1各泳道相似性分析显示, LB和TSB培养基与R2A及土壤浸出液培养基泳道相似性较低,图谱分析也表明这几个泳道间条带互补性强。这一情形暗示,上述贫、富营养培养基配合起来培养土壤微生物,则会获得更多种群。

图2显示, R2A及LB培养基获得条带数最多,其它几个泳道显现的条带也大多能在这2个泳道找到,且这2泳道相似性也较低。这暗示可用R2A及LB培养基替代其它培养基获得更多的细菌种群,如E1~E9条带代表的细菌用其它培养基难以培养得到。

试管静置培养是3种培养方式中氧气供给量最少的一种培养方式,目的是使微好氧的细菌也能培养获得。与三角瓶液体培养物相比,试管静置培养获得条带数多出3条,这可能代表微好氧细菌种群。图3显示,贫营养的R2A培养基获得条带数目也较多,亮度较大。这表明土壤中是存在众多“嫌贫好富”的细菌种群,且它们在微氧条件下生长良好,较之在富营养培养基上,适应性更强,如条带G1~G4代表的细菌就属于这一类型。另外,试管静置培养中也出现一些个体数目较多的“嫌富好贫”的细菌种群,如G5~G9所代表的细菌,它们只在富营养的LB和TSB培养基上出现。

本文与孙晓棠等^[17]的研究一起初步建立了利用DGGE技术对不同培养基回收分离细菌类群能力进行评价的方法。提示在研究过程中应当如何设计和选择使用培养基,有目的的培养土壤中众多至今未培养的微生物,最大限度地拓展微生物资源利用空间。

参 考 文 献

- [1] 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): 478-482.
- [2] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microb Rev*, 1995, 59(1): 143-169.
- [3] 王莹, 万欢, 吴根福. 环境微生态研究中的分子生物学新技术. 环境污染与防治, 2006, 28(6): 457-461.
- [4] 蓝希钊, 周泽扬. 未培养的微生物研究进展. 微生物学通报, 2005, 33(6): 116-119.
- [5] 郭斌, 吴晓磊, 钱易. 提高微生物可培养性的方法和措施. 微生物学报, 2006, 4(3): 504-507.
- [6] Zengler K, Toledo G, Rappé M, et al. Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15681-15686.

- [7] Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, *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 Microb*, 2002, **68**(5) 2391 – 2396.
- [8] Connon SA, Giovannoni SJ, High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microb*, 2002, **68**(8) 3878 – 3885.
- [9] 岳秀娟, 余利岩, 李秋萍, 等. 自然界中难分离培养微生物的分离和应用. *微生物学通报*, 2006, **33**(3): 77 – 81.
- [10] Jackson CR, Roden EE, Churchill PF. Changes in bacterial species composition in enrichment cultures with various dilutions of inoculum as monitored by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microb*, 1998, **64**(12) 5046 – 5047.
- [11] Kawai M, Matsutera E, Kanda H, *et al.* 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microb*, 2002, **68**(2) 699 – 704.
- [12] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江主编. 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1996, 78.
- [13] 张瑞福, 曹 慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化. *微生物学报*, 2003, **43**(2) 276 – 282.
- [14] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16SrRNA. *Appl Environ Microb*, 1993, **59** 695 – 700.
- [15] Simu K, Hagstr? m A. Oligotrophic baeterioplankton with a novel single cell life strategy. *Appl Environ Microb*, 2004, **70** :2445 – 2451.
- [16] Olson JB, Lord CC, McCarthy PJ. Improved recoverability of microbial colonies from marine sponge samples. *Microb Ecol*, 2000, **40** :139 – 147.
- [17] 孙晓棠, 姚 青, 刘琼光, 等. 利用 DGGE 评价不同培养基回收番茄根际细菌类群的能力. *微生物学报*, 2006, **46**(3) :482 – 486.

Improved culturability of soil bacteria using proper combination with various culturing medium

HU Yuan-sen^{1, 2}, LI Cui-xiang¹, SUN Fu-lin², WU Kun², JIA Xin-cheng^{2*}

(¹ College of bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

(² College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract To isolate more unique and previously unrecognized bacteria in soil samples, the culture difference under three incubation modes was investigated by using trophic, low-nutrient broth and soil extract as growth medium. Plate count proved that the oligotrophic medium resulted in a slow growth and consecutive colony formation over the course of incubation. On the 5th day, the most number of colony-forming unit was found on trophic LB and low-nutrient R2A, which was approximate 5 times as many as that isolated on 0.1 × LB. Of the 7 media, LB broth harvested the maximum bacterial communities, and novel species could be isolated as the nutrient was diluted to appropriate extent. The DGGE patterns of oligotrophic and rich nutrient culture collection displayed low similarity, however, the bands at various lanes exhibited complementary effect. When cultivated with static flask, LB and R2A media obtained more bacterial species, which concluded most species isolated by the other five media. Under the test tube incubation mode, the most species was also found in LB medium except some appeared only on R2A and TSB. Apparent bacterial communities difference could be detected between R2A, LB and TSB media. The experiment data may contribute much to the special medium design as well as improvement of bacterial culturability by using proper medium.

Keywords : bacterium ; culturability ; medium ; DGGE