

水体及沉积物中微生物的分离、检测与鉴定*

徐永健¹ 焦念志¹ 钱鲁闽^{1,2}

(厦门大学环境科学研究中心海洋环境科学教育部重点实验室 厦门 361005)¹

(国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005)²

摘要:微生物在海洋环境中起着非常重要作用, 对其的研究技术也在不断地发展。作者综述了海洋水体及沉积物环境中微生物的分离、检测与鉴定等方面的技术方法, 并评价它们在微生物工作中的有效性及效率, 指出各方法的优点和不足。

关键词:水体, 沉积物, 微生物, 分离, 检测, 鉴定

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0151-05

微生物是海洋生物群落的一个重要组成部分, 在海洋生态系的生源要素生物地球化学循环中起着重要的作用。作为分解者和次级生产者, 影响着生态系中 POM 的溶解与沉降, DOM 的形成和消耗, 无机营养盐的形成等生态过程; 微生物中有些种类还是初级生产者, 能通过光合自养、化能自养等营养方式生产有机物。微生物在海洋生态系统中起着重要的作用。

微生物在海洋环境中的重要性, 使得对它的研究要求不断地发展新的检测和鉴定技术。这些技术有: 显微镜方法、培养观察法、比色分析方法、分子方法。选择何种技术根据我们所要检测的类群及其生存环境的不同而异。微生物的检测和鉴定一般还分为定量或定性两类。

由于海洋环境的多样性和复杂性, 用上述的某些技术对微生物进行检测及鉴定, 必须把微生物从环境中分离出来才能进行(非原位方法)。采用任何一种技术分离环境中的微生物都不可能代表原环境中存在的微生物群落, 非原位方法的这个局限性使得原位技术得以发展, 其并不要求从环境中分离出微生物, 而是直接来判断在环境中存在的微生物种类或数量。

鉴于海洋环境中微生物分离、检测与鉴定的重要性, 下面对目前文献已报道的一些技术方法作一论述, 评价其在微生物工作中的有效性及效率, 并指出各方法的优点和不足。

1 微生物的分离

一般分离海洋环境微生物的方法, 都要从样品中分离出微生物并把它转移到缓冲介质中, 用缓冲溶液的目的是防止微生物细胞由于环境渗透压的改变而破碎, 另外可使我们更容易地检测和鉴定这些微生物。从环境中分离微生物是非原位检测和鉴定的第一步。

1.1 水环境 从水体中分离微生物相对比从沉积物中分离简单, 水样可直接进行微生物观察或接种到选择培养基上培养。但水样中常含有大量有机物或颗粒物, 因此分离

* 福建省科技攻关计划重大项目资助 (No. 2002Y005)

国家科技部“973”项目资助 (No. 2001CB409704)

收稿日期: 2003-07-21, 修回日期: 2003-10-10

前要求先把这些物质除去。而对微生物丰度较低的水环境,要先对水样进行浓缩后再进行分离。

1.1.1 离心:离心是分离水样中微生物最常用的方法。一般用12,096 g 15min 就能把水样中的细菌分离出来,病毒颗粒由于个体更微小,用超速离心机 ($> 3.0 \times 10^4$ r/min) 才能分离到。密度梯度离心,是一种分离水样中微生物的有效方法^[1]。该方法的优点在于在离心过程中,样品中的颗粒物在介质中得以分离,离心的过程就是颗粒在介质中分离的过程,结果通常是不同重量的颗粒在介质中的位置不同,相同重量的颗粒集中在一条带上,而不像传统的离心方法那样所有的颗粒都聚成一团。

1.1.2 过滤:过滤也是比较常用的分离水样中微生物的方法,根据分离微生物的种类不同,选用不同孔径的滤膜进行过滤。而在过滤过程中一般对真空负压也有所要求,负压过高易使膜上的细胞破裂,影响结果。

1.1.3 双向电泳:双向电泳是通过非均衡的交流电场诱导颗粒物作侧向运动,从而达到分离细胞的目的^[2]。使用双向电泳技术可以从环境中分离出特殊类型的微生物细胞。如:液体环境的细菌分离、有活性和无活性细胞分离、癌细胞与正常细胞分离以及红细胞和白细胞分离等。

1.2 沉积物环境 沉积物的异质性对微生物分离的影响很大,自由生活的微生物最易分离,吸附在颗粒上的最难分离;此外沉积环境中的高有机质含量以及沉积物存在的无氧状态等(除表面外),对微生物的分离也提出了特殊的要求。

1.2.1 离心:最简单的方法就是混合沉积物样品与缓冲溶液,充分摇动后进行离心,从上清液中分离微生物。用这种方法显然不能彻底地分离沉积物中的微生物。

1.2.2 超声波:用超声波处理沉积物混合溶液可提高微生物的分离,超声波中的高频声波可以破碎沉积物颗粒和分离出微生物细胞。一般都在缓冲溶液中进行,如样品先用甲醛固定,再在 PBS 缓冲溶液中进行 2.5min 50W 的超声波处理,可以分离到最大数量的吸附微生物^[3]。用超声波处理还可以同时分离沉积物中病毒粒子,1min 60W 冰浴分离病毒效果最好^[3]。使用超声波的一个限制就在于它是一个破坏性的技术,破碎沉积物的同时也造成微生物细胞的裂解。

1.2.3 离散差异离心技术:结合了离心和超声波技术的特点,能更有效地分离沉积物中微生物,这种方法的分离效率一般为 30% ~ 60%,大大高于只使用搅动、超声波等单一技术的处理(分离效率 < 10%)^[4]。在分离过程中,通常还会加入一些化学物质,如胆酸钠、Tris 缓冲液以及吐温等,可以降低颗粒间的表面张力,从而提高两个类似电荷表面间的排斥力,因此更有利于微生物细胞与沉积物颗粒分离。

2 微生物的检测和鉴定

2.1 非原位方法 培养方法:是检测环境微生物的最早技术,由于操作简便及成本低廉,培养方法在检测和鉴别环境微生物上的应用最为广泛。该方法主要限制在于所检测的微生物必需是可培养的,但据报道环境中可培养的微生物不到总数的 10%,而对于极端环境下的微生物能够用现有的技术手段可培养的仅有 0.001% ~ 1%,因此基于培养的技术不能应用于检测环境中的所有微生物。

Biollog 和 VITEK 系统:这两个系统是目前应用最为广泛的微生物快速鉴定系统^[5]。VITEK 检测的原理是根据微生物的氧化-还原代谢形成各自特有的“代谢指纹图谱”,从而得到准确的鉴定。但只能对纯种培养的微生物进行鉴别,对含有多种细菌的环境样

本中的不同细菌不能直接加以鉴别,须常规预处理;对有些菌的鉴定还需用生化补充试验。Biolog 系统是根据微生物利用底物(碳源)范围能力的不同来区分微生物。这个技术也要求从环境中分离微生物,但它无需分离培养纯化,可最大限度地保留微生物群落原有的代谢特征,以及更大限度地减少分离平板的劳动强度和时间^[6]。Biolog 的局限性在于这个系统也是在微生物生长基础上提供阳性的结论,不适于检测和鉴定不可培养的微生物。这个系统也不适于检测丝状的微生物如真菌等。

脂肪酸分析:不同的微生物类群间的 FA 分布是不一样的,某一类群微生物有着其明显的 FA “指印图谱”。磷脂脂肪酸 (PLFA) 分析和脂肪酸甲脂 (FAME) 分析是脂肪酸分析的两种主要类型。FAME 分析的是微生物细胞中的所有 FA,而 PLFA 仅分析细胞膜上存在的磷脂,排除了细胞中其它的贮存脂^[7]。与 Biolog 系统一样,脂肪酸分析也适用于考察微生物群落的变化特征^[8,9],不管采用 PLFA^[9] 或 FAME^[10] 所得的结果都很相似。而 FAME 方法拥有 MIS 自动样品分析系统故对样品有更大处理能力^[8]。

2.2 原位方法

2.2.1 显微镜观察法: 本方法一般用于环境样品的微生物计数,并不需要预先进行培养。(1) 表面荧光显微镜 (EFM): 是一种合适的对环境样品中的微生物进行计数的方法,使用 EFM,必需对样品中存在的细胞进行荧光标记,不同的细胞利用荧光素的能力不同,可以用来区分有活力和无活力的细胞^[3],而不必考虑其是否可培养。EFM 的局限性在于荧光素(如 AO 和 DAPI)可与环境中的有机物质结合,导致过高估计样品中的微生物数量。(2) 免疫荧光显微镜 (IFM): 荧光物质(如 FITC)通过抗原抗体相互作用吸附在微生物上,即荧光素与样品中的微生物细胞一一对应,在显微镜下对荧光进行计数就可得样品中微生物的量。使用该方法有利的一面是这个方法可以只针对单一菌株或某一类微生物(如用单克隆抗体探针),不利的一面是微生物上的抗原仅在某一环境条件下才得以表达(如在营养限制时)。(3) 电镜: 透射电镜 (TEM) 和扫描电镜 (SEM) 都用于检测和鉴别环境中的微生物。SEM 适于判断微生物细胞的表面特性,以及用于分析研究细胞与细胞之间、细胞与生境之间以及生物膜间的联结。TEM 比 SEM 有更大的分辨能力,更适合于来检测和鉴别病毒,如轮状病毒首次就是用电镜检测到的。(4) 流式细胞仪 (FCM): 主要是通过光学手段对细胞的成分或结构特性进行定性和定量,显微镜与细胞生物学的结合使的 FCM 拥有在几秒钟内就能分析成千上万的细胞,最适于分析水样中的微生物^[11]。FCM 也可用于对沉积物样品中微生物的进行定量,但必须先对样品进行预处理。此外,FCM 与分子技术结合,可以更好对样品中的微生物进行识别、计数和生物量的测定。如 FCM 与 FISH 技术的结合可对细胞进行定量及根据不同的核酸序列进行分选等等^[12]。

2.2.2 比色方法: 环境微生物的原位检测的比色方法主要是通过观察介质中颜色变化判断微生物的存在与否。而不同变色物质的使用用来区分不同的微生物类群或微生物的不同代谢状态。(1) MPN 和 CFU: MPN 是一种用来定量测量水样中微生物数量的方法,与形成菌落计数 (CFU) 不同,MPN 法是从一系列含有合适培养基试管中不能显示生长的培养物部分进行数学推理而得出活菌数的方法。该法已广泛应用于对环境微生物进行计数。(2) ELISA: 用来检测环境样品中的微生物,是通过抗原抗体相互间的作用来进行的。抗体与目标微生物表面特异抗原相联结,引起微生物团状聚集,肉眼可见。使用 ELISA 方法可定量检测环境样品中细菌、真菌及病毒的存在。这是一种间接方法,它的检测下限为每毫升含 10^5 微生物,不及其它方法(如 PCR 等)敏感,这是它的不可

足之处。

2.2.3 报告基因方法：用报告基因方法来检测环境中的微生物，这是比色方法和分子方法相结合在环境中的应用。目前用报告基因技术能够检测环境中的大部分细菌。(1) 色标基因：色标基因的表达可以通过底物显色来检测。包括有 *xylE*、*gusA*、*lacZY* 基因等。在自然或遗传转化状态下，当培养介质发生变色反应时，表示这些基因得以编码，表明环境中存在标记细菌的存在和分布。这一结论的前提是要求该基因标记细胞必须有代谢活性，否则难以检测。此外，这些基因如广泛存在于环境中，也会造成误差。(2) 生物发光报告基因：生物发光报告基因编码生物发光产物或荧光产物。包括 *luc* 基因、*Rluc* 基因、*lux* 基因和 *gfp* 基因等。该方法的优劣与色标基因方法相似。

2.2.4 分子方法：一般意义上的分子方法通常是指特别基因或核酸序列的分析或检测，但分子方法也包括对特殊蛋白或细胞特征结构或成分的检测，如脂类分子和细胞表面抗原等^[13]。(1) 核酸技术：优点是微生物在分析前不必培养甚至不必从样品中分离，适用于分析复杂结构的微生物群落，环境样品中的微生物可以通过分析样品的基因信息即加以解释^[14]。应用现有的分子技术可以对环境中的微生物的丰度和多样性进行全面地评价^[14]。还可利用沉积物中分离的 DNA 来评价微生物群落的遗传多样性^[15]，对已分离 DNA 进行重聚集分析也可得到环境中存在的种类多样性^[16]，应用 16S rRNA 标记寡核苷酸探针可检测环境中特异性类群的存在与否^[17]。(2) RFLP 和 RAPD：RFLP 的原理是利用能识别特定核苷酸序列的限制性核酸内切酶处理 DNA，形成各种不同长度的片段，然后通过电泳分离得到该序列的酶切指纹图谱。此法能够反应多个酶切位点所包含的 DNA 序列信息，因此在进行微生物群落物种多样性比较时能提供较丰富的信息，适用于较复杂的群落之间的比较。缺点是：末端片段所提供的序列信息混杂在其它片段的信息中，无法判断群落中有多少物种；二是 DNA 的荧光染色法的灵敏度较低。RAPD 的基本方法是：以 10bp 左右随机排列的 DNA 为引物，通过 PCR 扩增得到目的基因组 DNA 的小片段。RAPD 采用的引物对特定的基因来说不具有特异性，但通过这种技术得到的“指纹”却具有生物特异性。RAPD 的优点是引物设计方便，检测灵敏，多态性强。其缺点是：易受反应条件影响，稳定性差，经常会出现假阳性条带，RAPD 在估计群落多样性时略有不足，但在比较不同阶段的种群变化时极为有用。(3) DGGE 和 TGGE：变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 是一种用于分离相同长度 DNA 片段的方法，它可区分小到 1 个碱基的差异。该技术的基本点是在给定浓度的变性剂中，不同核苷酸序列的 DNA 片段产生不同程度的变性，DNA 片段中变性的部分越多，该片段电泳移动速率越低。DGGE 主要用于对核酸序列的分析，它适用于研究可分离 DNA 的任何环境样品。但要用到 PCR 来扩增已有的 DNA，因此它只可作为一种半定量的方法。温度梯度凝胶电泳 (TGGE) 与 DGGE 相似。但在 TGGE 中，变性剂浓度保持一致或不使用变性剂，在凝胶上的温度却逐渐地提高，当 DNA 通过整个凝胶时，会遇到不断增加的温度梯度。TGGE 比 DGGE 优点在于其不需要化学梯度，以及可以高效而快速地处理样品。但 TGGE 的特异性比 DGGE 略低一些。(4) 核酸探针：可分为 DNA 探针、cDNA 探针、RNA 探针及寡核苷酸探针等。该技术的原理是，两条不同来源的核酸链如果具有互补的碱基序列，就能够特异性的结合。因此特异探针经直接杂交后，我们通过检测特异探针上的报告标记，就可检测到样品中特异微生物的存在与否。报告标记的量与样品中存在的靶核酸的数量成比例^[13]。核酸探针使用广泛，特异性好、分辨力强。虽然核酸探针在环境微生物分析中很有用，但是该技术的灵敏度却是它广泛应用的重要

限制, 当样品中小于 10^6 细胞/mL 的微生物种群采用该技术就不能被准确地检测^[13]。

(5) FISH: 主要是利用针对 rRNA 基因或分子的特定区域, 设计特定系统类群或特定种类的寡核苷酸探针进行原位杂交。这种技术既可用于鉴定细胞形态和系统亲缘关系以及鉴定细胞的活性, 也可用于微生物的计数。FISH 技术已广泛地应用于微生物生态学和环境微生物学的研究。但 FISH 技术应用于环境中也存在着一些问题, 如信号强度较低而背景荧光太高; 此外由于所用的核苷酸序列均来自于可培养的菌株, 因此不能反映自然界中微生物的多样性。(6) 非核酸技术: 非核酸的分子技术是指根据细胞的特有物理性来检测和鉴别微生物, 前已有论述的有: FA 分析、ELISA 和 IFM 等等。

其它方法还有全细胞分析方法。即采用高温裂解质谱法 (PyMS), 得到微生物的“化学指印”。再通过比较所得的热解图, 可判断相应微生物间的关系。这是一个非原位的方法, 主要用于鉴定纯培养的微生物, 如细菌和真菌等。与其它的特定化学标记和核酸探针的检测方法相比, PyMS 可迅速获得结果, 约需 90 s, 一次运行可分析 300 个样品。

3 结论与展望

根据实验目的的不同, 我们选择不同的方法从环境中分离、检测和鉴定微生物。在确定该方法时, 我们还应考虑到所选方法的费用、化费的时间、采样环境及试验环境等等情况。如尽管许多培养方法相对费用少, 技术要求也不高, 但其要求一个较长的培养周期, 因此不能迅速提供我们所需的结果。

微生物的分离和鉴定方法在不断发展, 每一种方法都有其优点和不足, 没有一种是普遍适用的方法。只有在了解各种方法原理的基础上, 根据不同的实验目的, 对各方法进行改进, 从而会得到理想的结果。

参 考 文 献

- [1] Lindahl V, Bakken L R. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, **16**: 135 ~ 142.
- [2] Marx G H, Huang Y, Zhou X F, *et al.* *Microbiology*, 1994, **140**: 585 ~ 591.
- [3] Kepner R L, Pratt J R. *Microbiological Reviews*, 1994, **58** (4): 603 ~ 615.
- [4] Hopkins D W, Macnaughton S J, O' Donnell A G. *Soil Biology and Biochemistry*, 1991, **23**: 217 ~ 225.
- [5] 陈太基, 封幼玲, 戴建华, 等. *中国卫生检验杂志*, 1997, **7** (5): 262 ~ 266.
- [6] Buyer J S, Drinkwater L E. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, **30**: 3 ~ 12.
- [7] Palojarvi A, Sharma S, Rangger A, *et al.* In: Rangger A, Insam I (eds). *Microbial Communities: functional versus structural approaches*. Berlin: Springer, 1997, 37 ~ 48.
- [8] Haack S K, Garchow H, Odelson D A, *et al.* *Appl Environ Microb*, 1994, **60**: 2483 ~ 2493.
- [9] Pennanen T, Frostegard A, Fritze H, *et al.* *Appl Environ Microb*, 1996, **62**: 420 ~ 428.
- [10] Cartwright C D, Thompson I P, Burns R G. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, **19** (5): 1253 ~ 1261.
- [11] Porter J, Deere D, Hardman M, *et al.* *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, **24**: 93 ~ 101.
- [12] 郭沛涌, 沈煊庭, 张利华. *生命的化学*, 2001, **21** (6): 520 ~ 522.
- [13] Akkermans A D L, Mirza M J, Hamsen H J M, *et al.* *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, **15**: 185 ~ 194.
- [14] Leff L G, Dana J R, McArthur J V, *et al.* *Appl Environ Microb*, 1995, **61**: 1141 ~ 1143.
- [15] Griffiths B S, Ritz K. In: Rangger A, Insam I (eds). *Microbial Communities: functional versus structural approaches*. Berlin: Springer, 1997. 1 ~ 9.
- [16] Leung K, Strain S R, Debruijn F J, *et al.* *Appl Environ Microb*, 1994, **60**: 416 ~ 426.
- [17] Amann R I. *Molecular Ecology*, 1995, **4**: 543 ~ 554.