

# 低营养浓度培养基分离培养生物膜中的 细菌及其鉴定

代先祝<sup>1\*</sup> 梁晓丽<sup>2</sup> 邱勤<sup>1</sup>

(1. 西南大学资源环境学院 重庆 400715)

(2. 甘肃省庆阳市农业技术推广中心 甘肃 庆阳 745000)

**摘要:** 室内潮湿环境固体表面很容易形成细菌生物膜, 这些生物膜生长在不易清除或不被人注意的固体表面, 研究这一类生物膜中的细菌类群可以了解其中是否滋生着对人体健康有威胁性的致病菌或条件致病菌。选择某公共浴室内塑料表面生长的生物膜作为分离培养对象, 同时使用实验室最常用的 LB 培养基及其 10 倍稀释培养基(LB/10)作为分离培养基。结果表明在 LB 培养基上生长的细菌类群相对单一, 并且有单一类群占优势或抑制其他类群生长的现象; 而在 LB/10 培养基上生长的细菌具有更丰富的多样性, 并且各类菌的数量分布较均匀, 没有出现 LB 培养基中一种细菌占绝对生长优势的现象。对 LB/10 上生长的 8 个菌株的 16S rDNA 片段序列进行测定和系统发育分析, 发现与所分离的细菌系统发育相近的包括多株人体临床分离的病原菌以及未培养细菌(Uncultured bacterium)。

**关键词:** 低营养物浓度, 生物膜, 分离培养, 鉴定

## Isolation and Identification of Bacteria from Biofilm with Culture Medium of Low Nutrient Concentration

DAI Xian-Zhu<sup>1\*</sup> LIANG Xiao-Li<sup>2</sup> QIU Qin<sup>1</sup>

(1. College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China)

(2. Agricultural Technique Promotional Center of Qingyang, Gansu Province, Qingyang, Gansu 745000, China)

**Abstract:** On the solid surface of indoor moist environment bacteria grow to form biofilms easily, which are hard to remove because of its high adhesion. It is of great microbiological safety significance to research bacteria in such kind of biofilms. Here we isolated bacteria from biofilm growing on solid surface of a public bathroom with Luria Bertani medium (LB) and its 10-fold diluted medium (LB/10). We found that the biodiversity of bacteria growing on LB/10 was better than that of LB. Furthermore one species of bacterium overgrowing other bacteria phenomena was observed on LB but not on LB/10. Eight strains of bacteria isolated with LB/10 were identified by 16S rDNA analysis. They are clustered with some clinical isolates and uncultured bacteria. Considering the growing environment of these bacteria we also tested their detergent-degrading ability, and found that they could decrease the quantity of

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(No. CSTC 2008BB7095)

\* 通讯作者: Tel: 86-23-68250427; E-mail: daixianzhu@126.com

收稿日期: 2010-01-18; 接受日期: 2010-03-17

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

foam caused by detergent.

**Keywords:** Low nutrient concentration, Biofilm, Isolation, Identification

人类的生活环境中充满着微生物, 这些微生物几乎都是群集附着在生命的或非生命的固体表面, 由自身产生的多聚物基质所包围而形成有一定结构的生物膜(Biofilm)。与游离细菌相比较, 生物膜中的细菌对抗生素、去污剂的抗性比游离细胞高可达数百倍<sup>[1]</sup>。生物膜中致密的细菌群落结构增加了细菌间水平基因转移的频率<sup>[2]</sup>, 一方面这可能使得生物膜中的微生物获得对人类的生产生活更有益特性, 另一方面这也提高了各类病原菌或条件性致病菌的突变风险。浴室因湿度大易导致各类细菌聚集生长形成生物膜。Leah 等采用不依赖于培养的(Culture-independent)分子生物学方法分析样品的 16S rDNA 的方法, 调查研究了美国部分地区沐浴喷头中的细菌生物膜, 发现所调查的样品中几乎都有条件致病菌<sup>[3]</sup>。可见分析研究室内细菌生物膜具有重要意义, 但采用不依赖于培养的方法受样品 DNA 提取效率<sup>[3]</sup>、PCR 扩增的偏嗜性等影响<sup>[4]</sup>, 而且要对生物膜中的细菌进行生理特征研究, 须对其进行分离培养。研究表明降低培养基中营养物浓度能有效从土壤一类复杂生态环境中分离培养到未培养微生物(Uncultured bacteria)<sup>[5-6]</sup>, 但未见采用低营养物浓度培养基对室内环境生物膜中微生物的分离培养相关研究报道。本文采用低营养物浓度培养基分离培养了某高校浴室采集的生物膜中的细菌类群, 并对分离的部分菌株进行了 16S rDNA 序列分析鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

Taq 酶购自宝生物公司, DNA 切胶回收试剂盒购自 Promega 公司, PCR 扩增仪为 Bio-Rad 公司的 Peltier Thermal Cycler PTC-200, 引物合成委托上海博亚公司完成。

### 1.2 培养基

LB 培养基(g/L): Trypton 10, Yeast extract 5, NaCl 5, pH 7.0; LB 培养基稀释 10 倍即为 LB/10 培养基, 固体培养基在灭菌之前加入 20 g/L 琼脂粉。

无碳源基础盐培养基(g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.45,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.79,  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  0.1, NaCl 0.4,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2, pH 7.0。

### 1.3 样品采集及细菌分离培养

选取某公共浴室的塑料板表面生长的生物膜(浅橙色), 用无菌水冲洗生物膜表面, 以去除游离态的微生物, 然后用灭菌脱脂棉轻轻擦拭取得生物膜, 在酒精灯的火焰保护之下直接将脱脂棉上黏附的生物膜涂布在 LB 或 LB/10 固体培养基表面。将固体培养基置于室温见光培养, 以尽量保证与原来生长环境相似。

每天拍照记录微生物的生长情况, 培养 2 周后分别划线转接新的 LB 和 LB/10 固体平板, 以观察生长出来单菌落的情况。最后将 LB/10 上固体平板上具有不同培养特征的单菌落划线分离纯化。

### 1.4 细菌基因组 DNA 的提取及 16S rDNA 的 PCR 扩增

用高盐 SDS 裂解法提取细菌基因组 DNA。使用 16S rDNA 通用引物对, 正向引物 F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'; 反向引物 R: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增条件为: 95°C 2 min; 95°C 20 s, 51°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 5 min。扩增产物用 1% 琼脂糖电泳后切胶回收, 方法参照试剂盒说明书。

### 1.5 16S rDNA 序列测定及分析

16S rDNA 序列测序委托上海博亚公司完成, 测定后的序列在 NCBI 网站上用 BLAST 软件在 GenBank 上进行同源性比较。下载代表性序列, 用 MegAlign 软件的 Clustal 方法进行多序列比对, 生成系统发育树。

## 2 结果与讨论

### 2.1 LB 与 LB/10 培养基上菌体生长情况比较

采样直接涂布固体平板, 室温培养 48 h 后, LB 培养基上有菌落直径约 0.5 cm, 白色不透明, 边缘整齐, 圆形突起的菌落出现, 而 LB/10 培养基上未出现单个菌落, 仅有一层无色较薄的菌苔生长。与此相对的是 LB 培养基单个菌落以外的位置, 涂布样品的位置菌苔生长情况反而不如 LB/10 培养基上的菌苔; 96 h 后, LB 培养基上的呈单个菌落生长的细菌表现出比较明显的抑制菌落周围菌苔的现象, 其菌落周围无菌苔生长(图 1), LB/10 培养基上生长

的菌苔从颜色上更接近采样的生物膜。该结果表明, 使用高营养物浓度培养基分离生物膜中的细菌时, 会出现快速生长的微生物抑制其他微生物生长的现象, 低营养物浓度培养基更有利于重现生物膜的细菌类群组成。

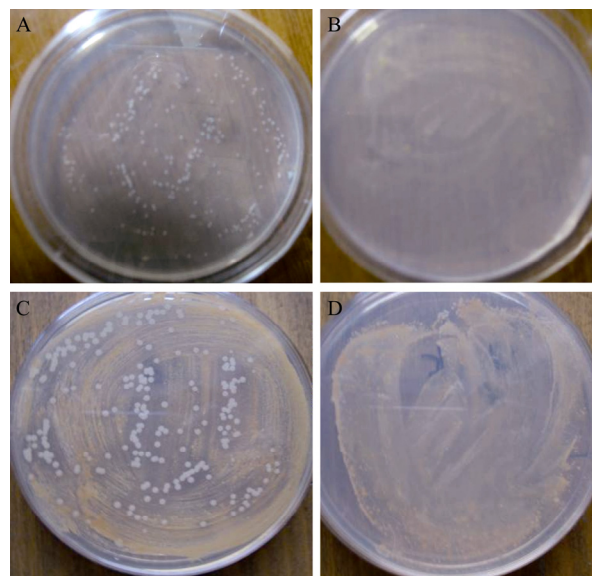


图1 取样涂布 LB 和 LB/10 固体培养基后细菌生长情况  
Fig. 1 The growth of bacteria on plate of LB and LB/10 from biofilm

Note: A: LB, 48 h; B: LB/10, 48 h; C: LB, 96 h; D: LB/10, 96 h.

## 2.2 菌苔划线分离结果

用灭菌接种环从 2.1 中的两种培养基上刮取菌苔(LB 培养基上刮菌苔的时候避开了 2.1 中提到的单个菌落), 分别在相应的培养基上划线分离, 室温培养 96 h 后观察发现 LB 培养基上生长的单菌落种类明显少于 LB/10 培养基, 而且明显是一类白色, 圆形, 凸起, 表面较干燥的菌落占生长优势, LB/10 培养基上没有出现一种微生物占绝对生长优势的现象(图 2)。该试验结果进一步证明相对营养物浓度较低的 LB/10 培养基更有利于重现所采集生物膜中细菌类群的组成。因此本文仅分离纯化了 LB/10 培养基上的具有不同培养特征的菌落, 进行进一步分析研究。共分离了 13 株菌, 分别命名为 D1-D13, 选取其中的 8 个菌株进行了 16S rDNA 序列分析。

## 2.3 16S rDNA 序列分析结果

从用 BLAST 搜索 GenBank 的结果中下载有代表性的同源序列, 用 MegAlign 软件的 Clustal 方法进行多序列比对, 制作了系统发育树(图 3)。从图中可以看到所分离的各菌株分别与 *Chryseobacterium*、

*Staphylococcus*、*Sphingomonas*、*Rhodococcus*、*Brevundimonas* 和 *Microbacterium* 等属的细菌 16S rDNA 发育地位相近, 有些菌株与采用分子生物学的方法仅获得 16S rDNA 未获得培养的细菌(Uncultured bacterium)进化地位接近。可见采用 LB/10 从生物膜中分离了丰富的细菌类群, 其中甚至可能包括新的菌种。

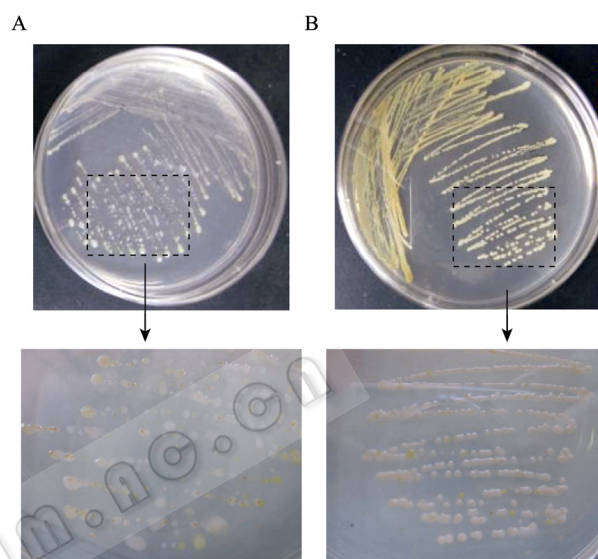


图2 划线分离培养后的细菌菌落生长情况

Fig. 2 The colonies on LB and LB/10 medium after streaking

Note: A: LB/10; B: LB.

Leah 等的研究表明, 浴室喷头上生长的生物膜中的微生物类群相对较简单, 45 个不同地点采集的生物膜中细菌种类分布在 2-29 个属左右<sup>[3]</sup>, 可见从种属数量上来说本文采用的方法可能已经分离培养了所分离样品的大部分细菌类群。本文分离的 *Staphylococcus* spp. 和 *Sphingomonas* spp. 在他们的样品中也存在, *Chryseobacterium*、*Rhodococcus*、*Brevundimonas* 和 *Microbacterium* 等属细菌在他们的结果中没有出现, 而他们的报道中检出率最高的 *Mycobacterium* spp. 却不在本文分离细菌之列<sup>[3]</sup>。室内生物膜中的细菌都是由人的活动带入或空气中漂浮的微生物, 其种类主要受周围环境影响, 因此这种所检出微生物种类的差异一方面可能是由生活环境不一样、微生物来源不同造成, 另一方面采用一种培养基只可能尽量多地分离培养目的微生物, 而不可能培养所有的微生物, 如 *Mycobacterium* spp. 的培养就需要特殊的添加物<sup>[7]</sup>。

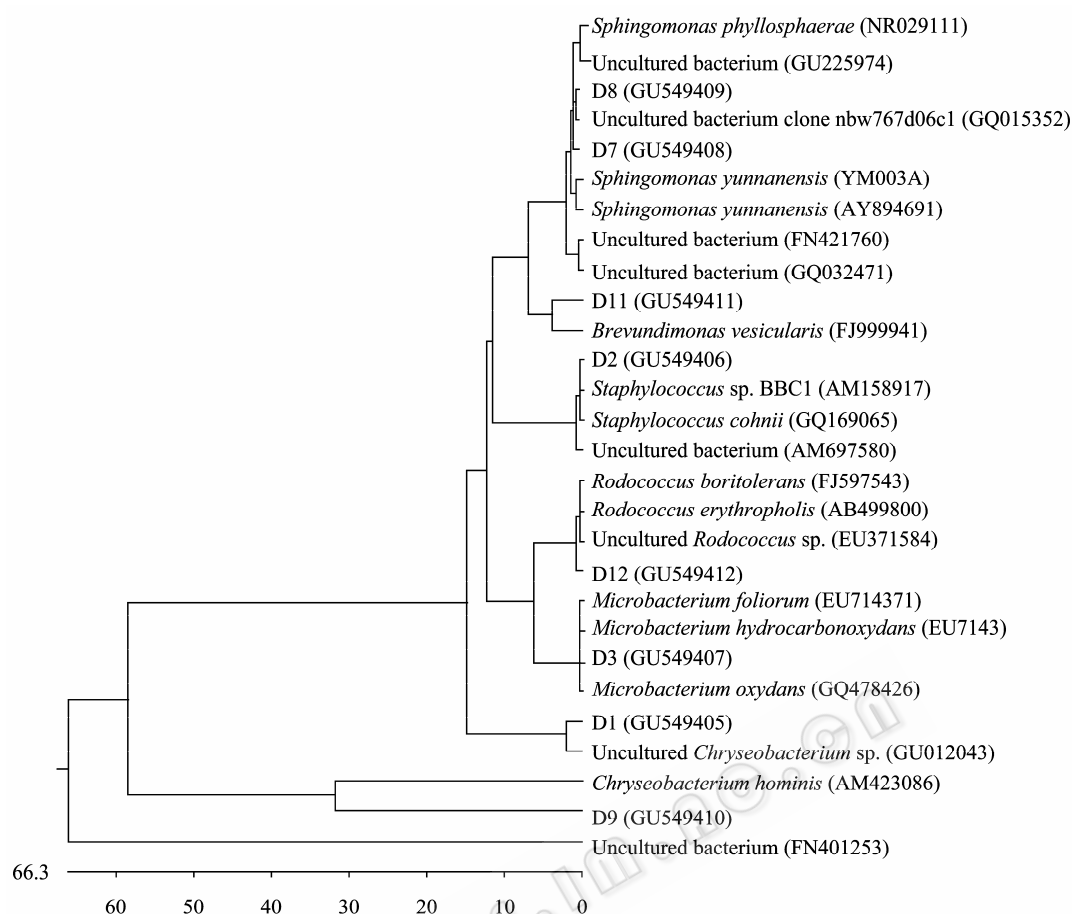


图3 根据各分离菌株的16S rDNA及其遗传发育相关序列得到的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA analysis of isolated bacterial strains and their phylogenetically close represents downloaded from GenBank

注: 刻度数字表示系统进化树的枝长度; 菌名后括号中列出了该菌在 GenBank 上的序列登录号。

Note: The scale and number in the bottom indicates the distance between the sequence pairs. Accession number in GenBank of all sequences is listed in brackets after the name of bacteria.

为了进一步分析所分离菌株可能具有的生物特性, 表1列出了BLAST的结果中与所比对菌株的序列同源性最高菌株及其来源或主要特性。从中可以看到其中包括了来源于地下水、污水、植物叶面、临床病原菌、有机物降解菌等不同来源的菌株。由此可推测所分析的细菌菌膜中一方面可能滋生着对人体有危害的病原菌, 需要对这些病原菌进行更多的研究后采取相应的措施抑制其生长, 另一方面该生物膜中也可能存在有机物代谢能力较强的细菌, 比如浴室中的菌膜长期接触大量高浓度的洗洁剂, 就有可能存在表面活性剂降解菌。表面活性剂在环境标准中被列为第二类污染物质, 表面活性剂进入自然水体会使水质变坏, 影响水生生物的生存, 阻碍其他污染物质的降解, 造成间接污染<sup>[12]</sup>。为此本文采用混合接种的方法初步检测了所分离细菌对表

面活性剂的降解情况。

## 2.4 分离培养的混合微生物及单个微生物对表面活性剂的降解效果

从各菌株的平板上挑取菌体混合接种添加了0.1%洗涤剂的无碳源基础盐培养基, 25°C振荡培养72 h后(图4), 可以看到混合菌能在添加洗涤剂的培养液中生长, 产生的泡沫明显比不接种对照少, 可见混合菌可以降解表面活性剂作为底物生长。一般从环境中分离功能微生物的思路是采用富集培养基培养后使用选择培养基分离, 这样可能遗漏在原始生态位点真正起作用的微生物<sup>[10]</sup>。本文所分离培养的细菌能有效降解表面活性剂的结果表明, 先采用合适的培养方法无选择性地分离培养尽量多的微生物资源, 然后再从其中筛选功能性菌株也可能是一种有效的分离方法。

表 1 与分离菌株系统发育最接近菌株的来源或主要特性  
Table 1 The origins or characters of phylogenetically close bacteria strains with bacteria isolated here

菌株 Strains	BLAST 结果中的菌株 Strains in BLAST result	序列同源性 Sequence homology (%)	来源或特性 Origins or characters	参考文献 Reference
D1	Uncultured bacterium	98	植物叶面	[11]
D2	<i>Staphylococcus</i> sp.	99	海洋沉积物	—
D3	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydants</i>	99	地下水	[9]
D7	Unidentified bacterium clone	98	污水处理系统	—
D8	Uncultured bacterium	98	人体皮肤表面	[10]
D9	<i>Chryseobacterium hominis</i>	99	医院临床分离菌株	[8]
D11	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	98	植物内生细菌	—
D12	<i>Rhodococcus boritolerans</i>	99	2-氰基吡嗪降解菌	—

注: —: 该菌的 16S rDNA 序列是直接向 GenBank 提供的, 没有对应的发表文献; D1、D2、D3、D7、D8、D9、D11 和 D12 在 GenBank 上的登录号依次为: GU549405–GU549412.

Note: —: This 16S rDNA sequence was submitted to GenBank without publication. The accession numbers of D1, D2, D3, D7, D8, D9, D11 and D12 in GenBank are GU549405–GU549412 respectively.

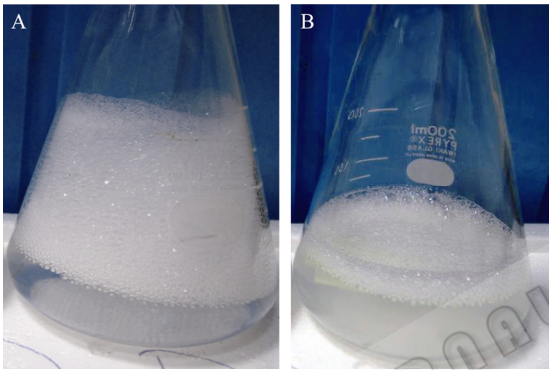


图4 混合菌直接接种降解洗涤剂的效果  
Fig. 4 Detergent-degrading by the bacterial mixture isolated in this paper  
Note: A: Control; B: Sample.

3 结论

本文的结果表明低营养物浓度培养基更有利于分离培养生物膜中的细菌, 所分析的浴室的生物膜中可能存在致病菌, 另一方面其中的某些菌株也可能在表面活性剂的生物降解中发挥重要作用。

参 考 文 献

[1] 李彤, 庄辉. 细菌生物膜的研究进展. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, **22**(3): 46–51.  
[2] 李蒙英, 沈标, 李顺鹏. 生物膜中水平基因转移及其促成的生物强化作用. 应用与环境生物学报, 2006, **12**(3): 57–62.  
[3] Leah MF, Laura KB, Kristen LP, *et al.* Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *PNAS*, 2009, **106**(38): 16393–16399.

[4] Tillmann L, Michael WF. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(1): 320–326.  
[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, **46**(3): 504–507.  
[6] Shayne JJ, Philip H, Parveen S, *et al.* Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(12): 7210–7215.  
[7] Nishiuchi Y, Maekura R, Kitada S, *et al.* The recovery of *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC) from the residential bathrooms of patients with pulmonary MAC. *Clin Infect Dis*, 2007, **45**(3): 347–351.  
[8] Mario V, Peter K, De Baere T, *et al.* *Chryseobacterium hominis* sp. nov., to accommodate clinical isolates biochemically similar to CDC groups II-h and II-c. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**(11): 2623–2628.  
[9] Kathrina G, Reinhard F, Guido F. Identities of *Microbacterium* spp. encountered in human clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 2008, **46**(11): 3646–3652.  
[10] Grice EA, Kong HH, Conlan S, *et al.* Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 2009, **324**(5931): 1190–1192.  
[11] Nathanael D, Claudia K. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *PNAS*, 2009, **106**(38): 16428–16433.  
[12] 王智, 吴幸强, 肖邦定, 等. 表面活性剂在滇池水体中的生物降解. 湖泊科学, 2008, **20**(1): 51–57.  
[13] John D, Scott W, Larry F. Genetic diversity through the looking glass: effect of enrichment bias. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(4): 1326–1331.