

虾池沉积物细菌多样性分析和若干可培养技术的优化探讨

蔡莹,李志江,田蕴,郑天凌*

(厦门大学 生命科学学院,滨海湿地生态系统教育部重点实验室,

近海海洋环境科学国家重点实验室,福建 厦门 361005)

摘要: 为了研究虾池沉积物细菌的多样性,改进培养技术,采用 8 种培养基培养虾池沉积物细菌,并用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对不同培养基平板获得的细菌群落结构进行研究,同时与原位样品的细菌群落结构进行比较.多数细菌在 2 周内长出,第 3 周至 12 周,在 VL55、DNB、HM₂ 和 DR₂A 平板上可分离出新的细菌,其他培养基平板上的菌落数目增长不明显.分别使用琼脂和结冷胶作为凝胶剂,结果发现,结冷胶平板和琼脂平板相比,表现出高保湿性、高菌落数和高细菌多样性的特点.变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析结果表明,沉积物样品中的优势细菌约 60 种,经过不同培养基培养后,得到的细菌多样性为 50 种左右,约为原来总数的 83%,但是细菌群落结构发生较大改变,优势菌群发生转化.测序结果证明了这一点.虾池沉积物中有着较高的细菌多样性.培养基的改进、结冷胶的使用和培养时间的延长有效提高了虾池沉积物中细菌的可培养性.

关键词: 虾池;沉积物;细菌多样性;变性梯度凝胶电泳;可培养技术;结冷胶

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2010)05-0731-07

自然界中的微生物分布广、种类多、资源极其丰富,据估计其种数高达 $10^5 \sim 10^6$,但能够在实验室培养的不足 1%^[1-2],大部分还处于未培养、未研究状态.近年来,研究和开发微生物资源成为研究的热点问题.研究者通过对培养基和培养方式的改进,从不同的自然环境分离得到了多种新的微生物类群. Connon 等采用高通量和寡培养基培养的方法使得近岸海水中微生物可培养比例升至 14%,远高于传统培养方法^[3]. Joseph 等结合寡营养培养、添加多种生长底物、延长培养时间(3 个月)等方法从土壤中获得分属于 60 个科、9 个门的 350 株细菌,其中 93 株为新种^[4]. Stevenson 等的研究也证实应用寡营养培养基、相对长期的培养、添加腐殖酸类物质等措施可以提高微生物的可培养性^[5]. Bollmann 等采用原位环境模拟技术从池塘沉积物中分离得到 184 株细菌,分属 10 个门,具有极高的多样性,16S rRNA 基因测序结果表明 26% 的菌株属于新种^[6]. 国外多项研究^[4,7-9]表明,结冷胶作为一种新

型的胶凝剂,替代琼脂使用后,可得到更好的培养效果.

近年来,我国研究人员对培养技术亦做了许多研究工作.如戴欣等采用稀释培养基对太湖沉积物可培养细菌进行研究^[10],孙风芹等采用改进的培养基从南海沉积物中得到 87 种细菌,分属 6 个大的类群^[11],叶姜瑜^[12]、郭斌^[13]、岳秀娟^[14]、郑天伦^[15]等亦有相关的研究论文发表.

为研究虾池沉积物中细菌多样性并探索好的培养方法,本研究在传统培养方法的基础上结合寡营养培养、多种底物的添加、延长培养周期、改良胶凝剂等策略对虾池沉积物中的细菌进行培养,采用 PCR-变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术测定原位环境和培养后的细菌群落结构,并引入 Shannon Wiener 多样性指数对细菌多样性进行分析.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

沉积物样品于 2007 年 1 月采自泉州东海海水养殖池.据泉州市东海区气象局的气候资料统计,该地区年均温度为 19.8℃,最低为 1、2 月份,平均温度 11.3

收稿日期: 2009-12-31

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2008AA09Z408);
国家自然科学基金重点项目、主任基金项目和面上项目
(40930847, 30940002, 40876061); 长江学者和创新团队
发展计划项目(40821063)

* 通讯作者: microzh@xmu.edu.cn

℃. 采样的养殖池由晋江与洛江形成的冲积平原上的滩涂开发而成, 地理位置为: $118^{\circ}41' E$, $24^{\circ}53' N$, 面积约 1.4 km^2 , 采用纳潮排污及半精养的养殖管理模式. 选取四角和中央区共 5 个采样点, 取表层 2~3 cm 的沉积物. 样品采集后装入无菌密实袋, 置于装有冰块的泡沫箱中, 立即带回实验室进行细菌分离.

1.1.2 培养基

共计使用 8 种培养基: 2216E、D2216E ($0.1 \times 2216E$)、VL55、DNB、HM₁、HM₂、R₂A、DR₂A ($0.1 \times R_2A$), 并采用 2 种胶凝剂: 琼脂和结冷胶, 因此一共有 16 种培养基平板. 其中, 2216E 培养基为常规使用的海水培养基; D2216E ($0.1 \times 2216E$) 为稀释 10 倍的 2216E 培养基; VL55 培养基、DNB 培养基和 R₂A 培养基的配制参见文献[16-17]; DR₂A ($0.1 \times R_2A$) 为稀释 10 倍的 R₂A 培养基; HM₁、HM₂ 为自制培养基, 它们是在基础盐溶液中分别添加质量分数为 0.001% 和 0.005% 腐殖酸所制成. 除 2216E 和 R₂A 培养基外, 其他培养基在灭菌后均需要添加过滤除菌的生长因子溶液、氨基酸混合溶液和微量元素溶液, 配方参考文献[18].

1.1.3 主要仪器和试剂

GIS-2008 凝胶成像分析系统和 EPS-100 水平电泳仪购自上海天能科技有限公司; 基因突变检测仪购自 Bio-rad 公司; T-Gradient PCR 仪购自 Biometra 公司; 结冷胶购自浙江中肯生物科技有限公司; DAPI 购自 Sigma 公司; 引物 341F 和 517R, RV-M 和 M13-47 由上海英骏生物技术有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 细菌的平板培养与计数

取不同采样点的沉积物各 1 g 混合, 加入无菌海水至 50 mL, 充分振荡混匀, 并进行梯度稀释至 10^{-4} . 选取 10^{-3} 和 10^{-4} 这两个稀释度的沉积物悬液各 100 μL , 分别涂布于上述 16 种平板上, 每个稀释度 5 个重复. 平板涂布后置于独立培养箱, 25°C 封闭培养 12 周. 倒平板时适当增加培养基的量, 并在培养箱内放置无菌水, 以保持较高湿度, 减少平板水分的蒸发. 培养箱使用前用甲醛熏蒸灭菌, 培养时将平板用封口膜包好. 在培养的 3 d, 1 周, 2 周, 12 周统计平板菌落数目. 通过阴性对照平板的设置以判断是否有杂菌污染.

1.2.2 沉积物总菌计数

取已充分振荡混匀的沉积物悬浊液, 静置后取适量上清, 加入 DAPI 工作液至终质量浓度为 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$, 4°C 条件下避光染色 25 min. 启动抽滤泵, 在小

于 7.09 kPa 负压下用聚碳酸酯膜过滤染色后的样品, 待膜抽干后置于载玻片上, 滴加镜油, 用表面荧光显微镜(OLYMPUS BX41)进行观察并均匀选择 10 个视野拍照, 然后统计每个视野中的细菌个数, 按下式计算水样中的细菌丰度:

$$\text{细菌总数}(\text{mL}^{-1}) = A \times S_1 / (S_2 \times V).$$

式中, A 为 10 个视野中细菌平均数, S_2 为视野面积, S_1 为滤膜有效过滤面积, V 为用于计数的液体样品的体积. 最后根据沉积物悬浊液中沉积物的实际含量进行换算, 得到最终的细菌丰度.

1.2.3 DNA 提取和 PCR 扩增

细菌培养结束后, 在平板上加入适量无菌水, 并用无菌涂布棒刮取菌体. 离心收集菌体, 并用于 DNA 提取. 以稀释后的 DNA 作为模板, 采用细菌通用引物 341F 和 517R 对 16S rRNA 基因的 V3 区进行温度梯度 PCR 扩增. 复性温度首先从 65°C 梯降至 55°C , 每个循环降低 1°C , 共 10 个循环. 之后复性温度为 55°C , 20 个循环. 以上操作参考文献[18].

1.2.4 细菌群落结构的 DGGE 分析

采用基因突变检测仪对 PCR 产物进行 DGGE, 以分析细菌群落结构. 所用的聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性梯度为 40%~65% (100% 的变性剂为 7 mol/L 尿素, 40% (体积分数) 甲酰胺). 在 110 V、 60°C 、 $1 \times \text{TAE}$ 溶液中电泳 10 h 后, EB 染色 20 min, 然后用 GIS-2008 凝胶成像分析系统拍照, 用软件 Quantity one 4.62 分析各电泳条带的数量及强度.

1.2.5 测序和序列分析

对切下的 DGGE 条带, 经过 PCR 扩增后, 用 DGGE 验证扩增产物与回收条带的电泳位置是否一致. 验证一致后, 纯化后的 PCR 产物用连接至 pMD19-T 载体, 热激转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中. 复苏后取适量菌液涂布于 Amp^r LB 平板上, 并结合蓝白斑筛选阳性克隆子, 菌落 PCR 扩增确认阳性克隆子.

将已验证的阳性克隆子接种于预先加入氨苄青霉素的 3 mL LB 灭菌液体培养基中, 37°C 培养过夜后, 送到上海英骏生物技术有限公司进行测序. 序列结果提交 Etaxon 2.1 服务器与模式菌株进行在线比对, 并采用软件 DNASTar 和 DNAMAN 分别进行序列分析和系统发育树构建. 此外, 还将序列信息输入美国国立生物技术信息中心 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 以补充分析结果.

1.2.6 细菌多样性指数

采用 Shannon Wiener 多样性指数 (H') 分析细菌

多样性, 该指数和物种丰富度 (Species richness, S)、Pielou 均匀度指数 (Pielou evenness index, J) 等指标被用来作为比较各个样品的细菌多样性的标准^[19,20]. 计算公式如下:

$$H' = - \sum P_i \ln P_i, \quad (1)$$

$$J = H' / \ln S. \quad (2)$$

其中, P_i 是某个样品中单一条带的强度在该样品的所有条带总强度中所占的比率, S 是某个样品中所有条带数目总和.

2 结果

2.1 沉积物总菌计数结果和平板菌落计数结果

所采集的 5 份沉积物细菌丰度在 $4.7 \times 10^8 \sim 1.9 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$, 等量混合后细菌丰度为 $1.0 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$.

在培养后的第 3 天、1 周、2 周和 12 周分别对平板上的可见菌落进行计数. 结果发现, 最初的 2 周内平板上菌落数量的增加非常明显, 多数培养基平板在 2 周后仍然有增加. 和第 3 天的计数结果相比, 培养 1 周时的菌落计数结果增加了 15.2% ~ 139.5%, 平均增加 33.4%; 2 周时的结果和 1 周时相比增加了 0 ~ 14.6% (仅 2216E 琼脂平板未增加), 平均增加 6.9%; 12 周时的结果和 2 周时相比增加了 0 ~ 10.4% (仅 2216E 的 2 种平板未增加), 平均增加 4.0% (图 1). 从菌落的形态上看, 这些后期出现的菌落的共同特点是形态微小, 直径通常不超过 1 mm, 边缘规则, 常以聚集状态存在, 较少单独出现.

培养 12 周后, 各种培养基平板的菌落数为 $8.8 \times 10^5 \sim 37.0 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$, 和总菌计数结果相比, 可培养细菌所占比例为 0.09% ~ 0.37%.

本实验每种培养基均采用了 2 种胶凝剂: 琼脂和结冷胶. 结冷胶平板保湿性较好, 不易干涸. 对同种培养基而言, 结冷胶平板最终长出的菌落数是琼脂平板的 93% ~ 358%, 平均比琼脂平板多 48%. 对 2216E、HM₁ 和 R₂A 培养基, 使用结冷胶和琼脂的效果较为接近, 菌落数差异在 10% 以内, 其他 5 种培养基使用结冷胶和使用琼脂的效果有明显差异, 其中以 DNB 培养基差异最大, 结冷胶平板上的菌落数是琼脂平板上的 3.58 倍.

2.2 DGGE 结果及多样性分析

对原位沉积物样品和培养后的样品进行 DNA 提

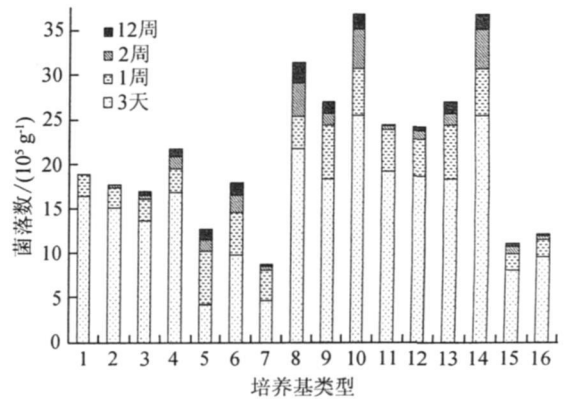


图 1 培养时间对不同培养基平板上菌落形成数目的影响
1. A2216E; 2. G2216E; 3. AD2216E; 4. GD2216E; 5. AVL55; 6. GVL55; 7. ADNB; 8. GDNB; 9. AD₂A; 10. GDR₂A; 11. AR₂A; 12. GR₂A; 13. AHM₁; 14. GHM₁; 15. AHM₂; 16. GHM₂

Fig. 1 The influence of culture time to colony number on different media plates

取和 PCR 扩增, 并进行 DGGE 电泳 (图 2). 使用软件 Quantity one 4.62 对 DGGE 图谱进行分析, 并按照方法 1.2.6 计算细菌多样性指数、均匀度指数和物种丰富度, 物种丰富度即相应泳道的 DNA 条带数. 结果见表 1.

在 DGGE 图谱中, 原位沉积物样品检测到 60 条条带, 说明原位沉积物样品中细菌多样性非常丰富, 这些条带比较均匀地分布在不同浓度的变性剂范围内 (图 2 中的 S 泳道). 经过 16 种不同平板培养后的样品在 DGGE 指纹图谱的带型上有较大差别, 条带数在 15 ~ 37 之间, 其中以 GDR₂A 平板样品得到的条带最多, 达到 37 条, AHM₂ 平板样品得到的条带最少, 仅 15 条. 部分优势条带在各样品中普遍存在, 但在原位沉积物样品中所占比例却较小, 并非最具优势的条带. 对培养后的各个样品的 DGGE 图谱比对发现, 培养后的各样品中共存在 50 条左右不同的条带, 而且部分条带位置一致, 这说明沉积物中占优势的细菌一部分在平板上可以生长.

Shannon Wiener 多样性指数一般在 1.5 ~ 3.5 之间, 很少超过 4.5^[19]. 在本研究中, 沉积物样品的 Shannon-Wiener 指数为 4.063 4, Pielou 均匀度指数为 0.992 4, 具有极高的多样性和均匀度. 平板培养样品的 Shannon Wiener 指数为 2.679 8 ~ 3.564 6, 仅 HM₂ 平板培养样品的值低于 3.0, Pielou 均匀度指数为 0.956 5 ~ 0.991 3, 也具有较高的多样性指数和均匀度.

2.3 测序结果

将原位沉积物样品 DGGE 图谱中的 23 条优势条

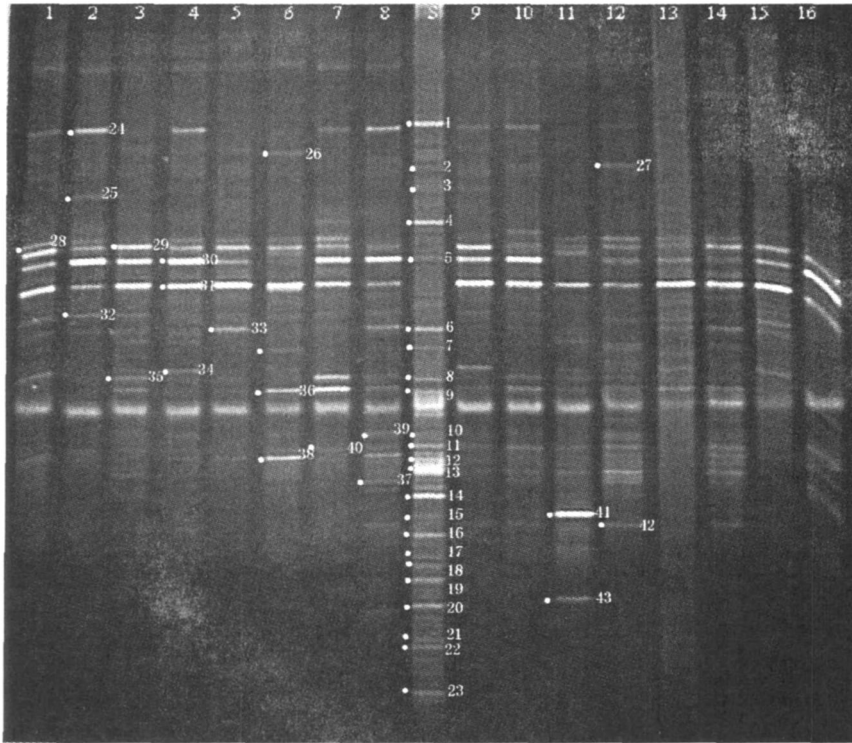


图 2 平板培养物和沉积物样品的 DGGE 图谱

1. A2216E; 2. G2216E; 3. AD2216E; 4. GD2216E; 5. AVL55; 6. GVL55; 7. ADNB; 8. GDNB; 9. AR₂A; 10. GR₂A; 11. ADR₂A; 12. GDR₂A; 13. AHM₁; 14. GHM₁; 15. AHM₂; 16. GHM₂; S. 沉积物样品

Fig. 2 DGGE profile of plate cultures and sediment samples

带(1~ 23 号序列)和各种培养基平板培养后样品 DGGE 图谱中的 20 条优势条带(24~ 43 号序列)切胶回收并测序. 将这些序列在 GenBank 中用 BLAST 进行检索和同源性比较, 可以确定各条带所代表的细菌的系统发育地位, 从而得到各样品细菌群落中优势菌群的组成. 测序结果已提交 GeneBank 收录, 登陆号为 GQ290391~ GQ290433. 分别对沉积物和培养物得到的序列构建系统发育树(图 3, 4).

通过与模式菌株的比对可以发现, 沉积物序列(GQ290391~ GQ290413)中多数序列与模式菌株有较大差异. 其中 12 条序列与最相近的模式菌株序列的相似度低于 97%. 而在培养后得到的序列中, 仅有 2 株与最相近的模式菌株的序列的相似度低于 97%. 这反映了培养后得到的微生物群落与原位环境发生了较大的变化. 值得注意的是, 培养后得到的菌株 GQ290428 与最相近模式菌株的相似度仅为 50.53%, 然而通过

表 1 Shannor Wiener 指数(H')、物种丰富度(S)及均匀度指数(J)分析

Tab. 1 Analysis of Shannor Wiener Index (H'), Species richness (S) and Pielou evenness index(J)

样品	Shannor Wiener 指数	物种丰富度	均匀度指数
2216E(A/G)	3.0400/2.9982	22/21	0.9835/0.9848
D2216E(A/G)	3.1723/3.2910	25/28	0.9855/0.9876
VL55(A/G)	3.0397/3.1039	24/23	0.9565/0.9899
DNB(A/G)	3.1696/3.2670	25/27	0.9847/0.9913
R ₂ A(A/G)	3.0811/3.1292	23/24	0.9827/0.9846
DR ₂ A(A/G)	3.4300/3.5646	32/37	0.9876/0.9872
HM ₁ (A/G)	3.0950/3.2855	23/28	0.9871/0.9860
HM ₂ (A/G)	2.6798/2.7113	15/17	0.9896/0.9570
沉积物	4.0634	60	0.9924

注: A 为琼脂平板的结果, G 为结冷胶平板的结果.

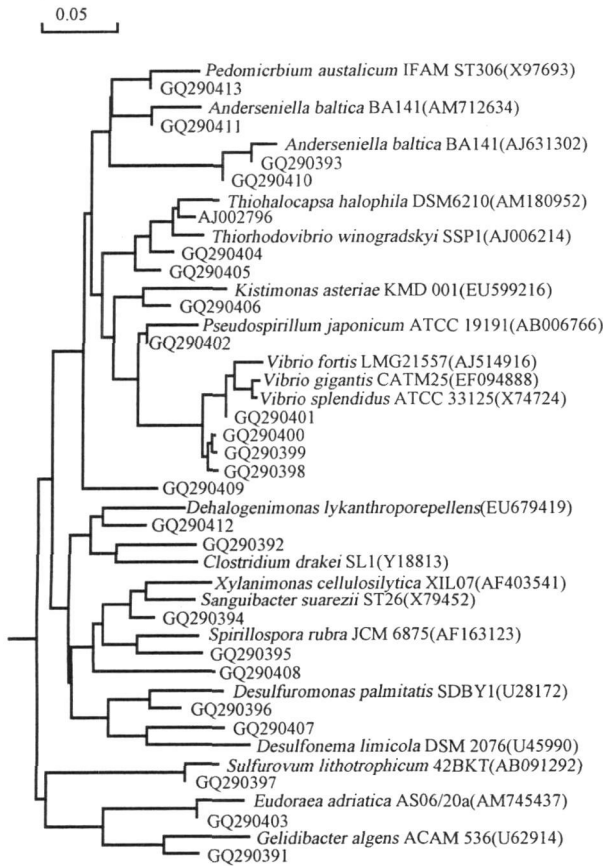


图 3 沉积物 DGGE 条带测序后构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed by DGGE band sequences of the sediment

BLAST 却发现存在与之完全相同的菌株. 这说明了两种比对方法应相互补充. 前者通过与模式菌株比对, 结果较准确; 后者可与更多的序列比对, 得到的信息更为广泛.

通过 BLAST 分析认为, 沉积物样品测序的 23 条序列中, 2 个属于环境中的未知菌群, 15 个属于变形菌门 (Proteobacteria), 包括 α 变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 4 株, γ 变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 8 株, δ 变形菌纲 (Deltaproteobacteria) 2 株, ϵ 变形菌纲 (Epsilonproteobacteria) 1 株, 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 2 株, 绿弯菌门 (Chloroflexi) 2 株, 放线菌门 (Actinobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 各 1 个. 有 9 条序列与 GeneBank 中无完全相同的序列, 约占总数的 39%. 在测序的 23 条序列中, 其最相近的序列多数为未培养样品, 仅有 4 条序列与已培养的弧菌序列最为接近. 一般认为, 如果两株细菌的 16S rDNA 序列同源性小于 98%, 即可认为它们属于不同的种, 如果同源性小于 93% ~ 95%, 则可认为属于不同的属. 1 号序列与最相近的序列 (EU283479) 相似度仅为 94%, 12 号

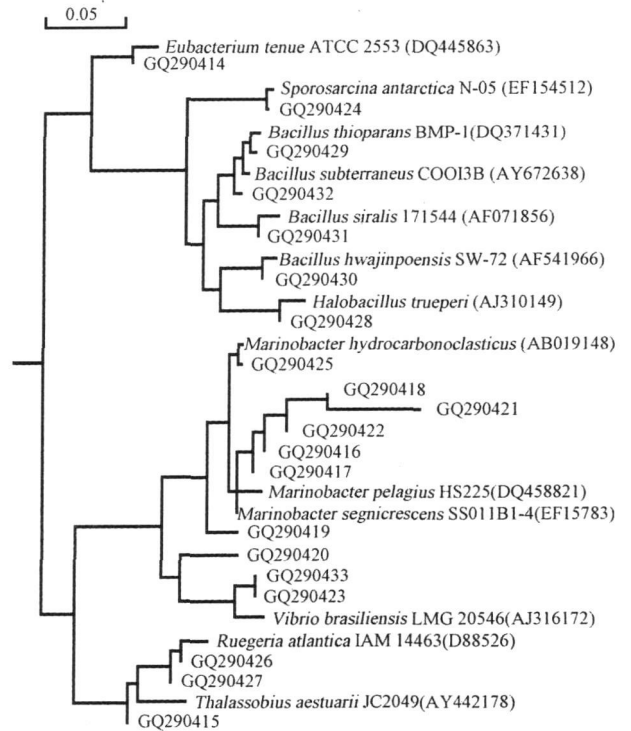


图 4 培养物 DGGE 条带测序后构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed by DGGE band sequences of the cultures

序列与最相近的序列 (DQ421467) 相似度仅为 95%, 17 号和 18 号序列与最相近的序列相似度分别为 96% 和 97%. 这 4 条序列所代表的细菌很可能属于新的种.

通过图 3 与图 4 的对比可发现, 二者的特点不同. 在培养后的样品中, 其系统分类趋于两大类群, 细菌多样性不如原位沉积物中. 尽管如此, 在得到的 20 条序列中, 仅 5 条序列与模式菌株完全一致. BLAST 发现, 有 9 条序列与 GeneBank 中无完全相同的序列, 约占总数的 45%. 有 2 条序列与模式菌株的相似度低于 97%, 有较大几率为新种.

3 讨论

3.1 技术讨论

结冷胶是一种新型的微生物胞外多糖, 依靠其自身优越的理化性质, 已经广泛应用于食品、制药和化工等众多领域, 并且广受好评. 结冷胶具有良好的分散性, 成胶具有高度的透明度, 能够在极少用量 (如琼脂的 1/6) 的条件下生成高质量的凝胶; 显著的温度滞后性是其应用于凝胶剂的必要条件; 结冷胶形成的凝胶具有良好的稳定性、耐酸、耐高温、能抵抗微生物以及

各种酶的作用,在高压蒸煮和烘烤条件下均很稳定;良好的组织相容性使得结冷胶可以与其他各种类型的亲水胶体进行良好的复配,交联产生具有优良特性的增稠剂和稳定剂。

本实验共对平板上的菌落进行了4次计数,时间分别为培养3天、1周、2周和12周。在2周内,各平板的菌落数一直处于增加状态。2周后除2216E平板外,其他14种平板上的菌落数仍有所增加,平均增加4.0%,最多增加10.4%。这种趋势与Davis等^[21]在12周的连续观察中的结果较为相似。本实验中使用了结冷胶,结冷胶比琼脂具有更好的保湿性能,有利于延长培养时间。在实际操作时,通过在培养箱中放置无菌水,大大降低了平板中水分的蒸发速率,使得所有结冷胶平板能够在12周时仍未干涸,提高了环境样品微生物的可培养率。与此同时,部分琼脂平板在12周时则已经干涸。在所使用的8种培养基中,对于2216E、HM₁和R₂A培养基,使用结冷胶和琼脂的效果较为接近。其他5种培养基(D2216E、DNB、DR₂A、VL55和HM₂),结冷胶平板上明显长出了更多的菌落,平均比琼脂平板多48%。通过图1的对比可以发现,两类平板培养效果的差异并非在2周后才出现的,在培养前期,大多数结冷胶平板上已长出了更多的菌落,并一直保持了这种优势。其机理有待进一步研究。

结冷胶在国外已被用于微生物培养的研究,如Joseph等使用结冷胶作为胶凝剂以延长培养时间,并结合其他手段,从澳大利亚一牧场的土壤中分离得到350株菌,分属于9个门60个科,具有极高的多样性^[4]。但在国内微生物领域还较少被使用。有研究证明,结冷胶平板在某些种属微生物的培养中,能够起到比琼脂平板更好的效果。如在使用结冷胶和琼脂来配制固体培养基对嗜温的甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)细菌和产甲烷细菌(*Methanobrevibacter*)进行培养时,结冷胶显示了比琼脂更佳的胶强度和透明度,在可培养菌落计数和菌落形态大小方面,结冷胶平板的指数均高于琼脂平板^[8];在未培养微生物的研究中,证明结冷胶平板不仅可以获得比琼脂平板更多的菌落计数结果,还可得到新的菌株和难培养微生物^[4,21];在细菌学、临床实验学研究中,也证明结冷胶可以作为琼脂的替代品,甚至可以得到比它更好的效果^[7]。结冷胶除了可以用作固体培养基的凝固剂之外,还可以替代琼脂糖应用于DNA片段的电泳检测^[9]。

在通常的研究中,细菌经培养后往往要经过纯化,再进行下一步的鉴定工作。尽管这种方法可靠性强,能提供较为详细的信息,但是这一系列的细菌分离、纯化和

和鉴定工作的工作量大、周期长,往往需要数月才能得到批量的结果。DGGE技术被广泛应用于对环境样品微生物多样性的分析,但较少使用于微生物培养物的分析。尽管DGGE技术具有一定缺陷,如只能检测到占总群落1%以上的细菌,会遗漏部分非优势细菌,但是其具有方便、快捷的优点,可以在1~2周内得到细菌群落结构组成的相关信息,有利于工作效率的提高。

3.2 培养前后优势菌群的变化

通过对DGGE图谱的直接观察和对测序结果的分析,均可发现,尽管本实验中通过培养得到了较高的细菌多样性,但优势菌群仍然发生了明显改变。

通过方法的改进,本研究中可培养微生物得到了较高的多样性,但是通过DGGE技术对培养前后条带的比对仍可发现,占显著优势地位的菌群已发生显著改变,测序结果也进一步验证了这一点。这种变化可能的原因有多种,不但与细胞的生理状态有关,也与生境的急剧变化有关,如共同协作的自然生存方式的崩溃、生境的极度营养变化、急剧改变的生态位^[12]、生长缓慢的微生物被忽视^[13]等。原位沉积物样品中,蕴藏着丰富的未培养微生物资源,有待进行进一步研究和探索。

参考文献:

- [1] Belinda C Ferrari, Binnerup S J, Gillings M. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8714-8720.
- [2] Kaberlein T, Epstein S S. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. Science, 2002, 296: 1127-1129.
- [3] Connors S A, Giovannoni S J. High throughput methods for culturing microorganisms in very low-nutrient media yield diverse new marine isolates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3878-3885.
- [4] Joseph S J, Hugenholtz P, Sangwan P, et al. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7210-7215.
- [5] Stevensen B S, Eichorst S A, Wertz J T, et al. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4748-4755.
- [6] Bollmann A, Lewis K, Epstein S S. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(20): 6386-6390.

- [7] Daniel S, Mary V, Vicki T, et al. Gelrite as an agar substitute in bacteriological media [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 46(4): 840-845.
- [8] Harris J E. Gelrite as an agar substitute for the cultivation of Mesophilic *Methanobacterium* and *Methanobrevibacter* species [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50(4): 1107-1109.
- [9] Michael P, Schmidt R D. Gellan gum as a suitable gelling agent in microbiological media for PCR applications [J]. Journal of Medical Microbiology, 2001, 50: 108-109.
- [10] 戴欣, 王保军, 黄燕, 等. 普通和稀释培养基研究太湖沉积物可培养细菌的多样性 [J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 161-165.
- [11] 孙凤芹, 汪保江, 李光玉, 等. 南海南沙海域沉积物中可培养微生物及其多样性分析 [J]. 微生物学报, 2008, 48(12): 1578-1587.
- [12] 叶姜瑜, 罗固源. 微生物可培养性低的生态学释因与对策 [J]. 微生物学报, 2005, 45(3): 478-482.
- [13] 郭斌, 吴晓磊, 钱易. 提高微生物可培养性的方法和措施 [J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 504-507.
- [14] 岳秀娟, 余利岩, 张月琴. 自然界中处于 VBNC 状态微生物的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 108-111.
- [15] 郑天伦, 王国良, 金珊. 细菌的“活的非可培养状态” [J]. 自然杂志, 2004, 24(4): 209-212.
- [16] Schoenborn L, Yates P S, Grinton B E, et al. Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum level diversity of soil bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(7): 4363-4366.
- [17] Bartscht K, Cypionka H, Overmann J. Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 28: 249-259.
- [18] 蔡莹. 对虾养殖沉积环境细菌多样性的分子分析与若干可培养技术优化探讨 [D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [19] 马克平, 刘玉明. 生物群落多样性的测度 I α 多样性的测度方法 (下) [J]. 生物多样性, 1994, 2(4): 231-239.
- [20] Quin A, Burel F. Influence of herbaceous elements on butterfly diversity in hedgerow agricultural landscapes [J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2002, 93: 45-53.
- [21] Davis K E R, Joseph S J, Janssen P H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 826-834.

Bacterial Diversity in Aquaculture Environment and Optimization of Culturing Technique

CAI Ying, LI Zhijiang, TIAN Yun, ZHENG Tianling*

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: To study bacterial diversity of shrimp pond sediment and improve culture technique, 8 kinds of media were used to isolate bacteria from shrimp pond sediment. Bacterial colonies were collected and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique was used to study the bacterial community structure and it was compared with that of *in situ* sample. Most of bacteria appeared in the first 2 weeks. During the 3rd week and the 12th week, there were some new isolates on VL55, DNB, HM₂ and DR₂A plates, and the colony number was not obviously increasing on other plates. Agar and gellan gum were used as gelling agent separately, the culture results showed that gellan gum plates had a high moisture retention, more bacterial number and high bacterial diversity than that on agar plates. By the analysis of DGGE profile, there were about 60 kinds of bacterial strains in the sediment. Cultured by the media, about 50 kinds of bacterial strains were detected. The number of it was up to 83% of that of the sediment. However, the bacterial community structure had a great variation and the dominant microorganisms changed. It was confirmed by sequencing results too. There were high bacterial diversity in the shrimp pond sediment. Improvement of medium, using of gellan gum and prolongation of culture time effectively obtained the culturability of the shrimp pond sediment.

Key words: shrimp pond; sediment; bacterial diversity; DGGE; culture technique; gellan gum