

淡水浮游细菌群落采集、过滤与保存

Sampling, filtration and storage of bacterioplankton community in freshwater

续子杰^{1,2}, 肖鹏¹, 杨义刚^{1,2}, 杨军^{1,*}

¹水生生态健康研究组, 城市环境与健康重点实验室, 福建省流域生态重点实验室, 中国科学院城市环境研究所, 厦门, 福建; ²中国科学院大学, 北京

*通讯作者邮箱: jyang@iue.ac.cn

摘要: 浮游细菌是水体中营浮游生活的原核生物, 是水生态系统的重要组成部分。本文介绍了淡水水体中浮游细菌群落过滤富集方法和有关注意事项。本方法可应用于水体微生物研究, 所收集的浮游细菌样品适用于下游的生物大分子提取、DNA 和 RNA 测序等实验。

关键词: 淡水, 浮游细菌, 自由生细菌, 颗粒附着生细菌, 过滤收集

浮游细菌

浮游细菌是水体中营浮游生活的原核生物, 具有极高的物种多样性, 是淡水和海洋生态系统的重要组成部分, 在物质循环过程中发挥关键作用。绝大多数细菌细胞(个体)大小为 0.2–2 μm 。然而, 在自然水体中, 浮游细菌具有两种常见的生活方式: 自由生和颗粒附着生。两类细菌在生活方式、群落组成、生态功能等方面存在显著差异, 我们有必要分别进行研究。自然水体中浮游细菌数量虽然很高, 过滤富集是最常见的一种方法。本文以深水水库为例介绍淡水水体中浮游细菌群落采集、过滤富集采样及保存方法。

材料与试剂

1. 聚碳酸酯滤膜 (3 μm : Millipore, TSTP04700; 0.22 μm : Millipore, GTTP04700)
2. 200 μm 尼龙筛网 (绍兴华丰, 80 目)
3. 2 ml 离心管 (KIRGEN, catalog number: KG2111)
4. 铝箔纸 (CLEANWRAP, catalog number: CF-3)
5. 盐酸 (国药集团, catalog number: 10011018)

仪器设备

- 30 1. 水深测深仪 (Speed Tech, model: SM-5)
- 31 2. 多参数水质分析仪 (Hach, model: Hydrolab DS5)
- 32 3. 采水器 (武汉轩仕霖, model: MY-013)
- 33 4. 水泵及配套水管、电源 (丰远, model: FY-2-48DC)
- 34 5. 不锈钢无菌过滤器及配套玻璃滤杯、砂芯滤头 (天津津腾, model: JTFA0214)
- 35 6. 无油隔膜真空泵 (上海亚荣, model: SHZ-III)
- 36 7. 抽滤瓶 (成都蜀牛, model: GG-17)
- 37 8. 超低温冰箱 (Thermo, model: ULT1386-5v)
- 38 9. 高压灭菌锅 (TOMY, model: Sx-500)
- 39 10. 5 L 量杯 (广州锂阁, model: LG01-112-9)
- 40 11. 500 ml 量筒 (Nalgene, model: 3664-0050PK)

41

42 实验步骤

43 一、野外水体样品采集:

- 44 1. 选择合适的采样站位, 使用测深仪测量水深, 现场拍照并记录采样时间 (精确到分
45 钟)、天气和周围环境情况。
- 46 2. 使用多参数水质分析仪测定采样站位水体剖面的水质参数: 提前设置多参数水质分
47 析仪存储文件名, 对分析仪进行校准; 连接好主机、电缆和牵引绳 (带刻度), 并
48 确认各接口是否牢固; 拉动牵引绳, 将探头完全沉没到水体中, 待数据稳定后保
49 存数据 (以分析仪面板上水深数据为准), 向下移动探头、每间隔 0.5 m 进行测定并
50 保存数据 1 次。如果仅采集表层水体样品, 则通常测定距离水体表面 0.5 m 处的水
51 质参数。
- 52 3. 明确水体分层状况 (以温跃层或氧跃层为例): 根据水温在水体垂直剖面分布情况
53 确定温度急剧变化的水层 (温跃层), 其上层和下层分别为湖上层、湖下层; 根据
54 水体中溶解氧的垂直剖面分布情况确定溶解氧急剧变化的水层, 即氧跃层。此外,
55 还可根据真光层和叶绿素最大层等特征划分不同水层、确定采样水深。通常, 根据
56 研究目的和实际需求选择水层划分方法。
- 57 4. 水体样品采集: 根据上一步骤明确取样水层后, 使用 5 L 采水器或水泵套件分别对
58 不同水层水样进行采集, 采集前应检查采水器是否完好 (如底部出水口有无堵塞,

挂耳是否松动，上盖是否开裂)；水泵套装是否正常（如水管接头是否漏水，电线是否磨损，电池电量）。

5. 采集的水体样品灌装于相应的聚乙烯塑料桶，塑料桶桶身应提前标记样品编号、采样深度、采样时间等重要信息，并使用对应深度的原水润洗 3 遍，防止样品交叉污染。

6. 采集的水样需要在 1 小时内送回实验室，立即进行处理；或放置于车载低温冰箱 4℃保存并运回实验室。

二、浮游细菌过滤富集前准备：

1. 离心管、抽滤瓶、滤杯、滤头应提前用高压灭菌锅灭菌（121 ℃，30 分钟），并使用烘箱（60 ℃）烘干。

2. 玻璃砂芯过滤装置如果出现堵塞问题可将其置于 1:10 盐酸（体积比）浸泡过夜（浸泡至砂芯会重新变白色），再使用超纯水清洗干净。

3. 过滤前，利用超纯水检查玻璃砂芯过滤装置是否漏水，如有漏水情况应及时更换。

4. 如果需要区分自由生浮游细菌和颗粒

附着生浮游细菌样品，抽滤瓶应提前用铝箔纸密封，使用高压灭菌锅灭菌（121 ℃，30 分钟），并放至室温，经超纯水润洗后再使用。

三、浮游细菌过滤富集：

1. 将玻璃砂芯过滤装置、不锈钢无菌过滤器、抽滤瓶和真空泵连接组装好，确保玻璃砂芯过滤装置不漏水、整套装置不漏气。

2. 将聚乙烯塑料桶中的原水摇匀后，使用 200 μm 尼龙筛网过滤至 5 L 量杯，先过滤 50 mL 水样润洗量杯、量筒和过滤装置，弃去润洗水后再过滤一定体积的原水用于收集浮游细菌样品。注意：不同水样的量杯和量筒提前做好标记，不得混用。

3. 浮游细菌整体群落富集：

1) 使用镊子将 0.22 μm 聚碳酸酯滤膜置于玻璃砂芯滤芯中央（镊子在使用前进行高温灭菌（121℃，30 分钟）、烘干），用配套滤杯固定并夹紧后，添加适当体积的原水样品，启动真空泵，调整抽滤系统内气压至 0.02 MPa。水样可多次添加，直至收集的样品量能满足后续实验要求，一般每次加水样量不少于 50 mL。通

常, 每张滤膜的过滤总时长不得少于 30 分钟, 以确保收集到足够的细菌生物量。富营养化较严重的水体过滤水样体积约 200 mL, 贫营养水体过滤水样体积可超过 2000 mL。注意: 一定要记录过滤时间和过滤水样的体积。

2) 完成样品过滤富集后, 将铝箔纸裁剪至合适大小, 用镊子夹住滤膜的白色边缘, 将滤膜转移至铝箔纸中央, 将铝箔纸对折至长条状放入灭菌后的 2 mL 离心管保存。此过程中, 镊子尖部严禁触碰滤膜中央的细菌样品区; 对折铝箔纸时应保证滤膜中央的样品区不被铝箔纸污染。如果出现样品污染或滤膜破损, 则该样品作废。

3) 离心管应写明样品编号、过滤时间、过滤体积和管内滤膜数量等信息, 记录字迹要清晰。注意: 上述信息至少标记两遍、防止信息缺失。

4. 自由生、附着生浮游细菌样品富集:

为区分自由生、颗粒附着生浮游细菌, 需要使用不同孔径滤膜收集样品。鉴于目前国际上没有统一的标准孔径用于定义、区分自由生细菌和颗粒附着生细菌, 本实验中以最常用的 3 μm 孔径为例进行介绍, 具体方法如下:

1) 抽滤瓶应提前用铝箔纸密封, 使用高压灭菌锅灭菌 (121 $^{\circ}\text{C}$, 30 分钟), 并放置至室温, 利用超纯水润洗干净。

2) 组装好抽滤系统后, 使用镊子将 3 μm 孔径聚碳酸酯滤膜置于玻璃砂芯滤芯中央, 用配套滤杯固定并夹紧后, 添加 50 mL 原水样品, 启动真空泵, 调整抽滤系统内气压至 0.02 MPa, 样品过滤好后过滤水用于润洗抽滤瓶再倒掉。注意: 每次更换不同的样品都需要重新润洗抽滤瓶, 以防止样品交叉污染。

3) 重新组装好抽滤系统后, 继续添加原水样品直至收集的样品量满足后续要求。收集到 3 μm 孔径滤膜上的浮游细菌可以当作颗粒附着生细菌, 记录过滤持续时间和过滤水样体积。注意: 每张滤膜收集水样的过滤时间不得少于 30 分钟。

4) 完成过滤后, 取下 3 μm 孔径聚碳酸酯滤膜并用铝箔纸包裹, 放入灭菌后的 2 mL 离心管保存。将上一步骤中产生的过滤后水样收集至干净的 5 L 量杯, 用于收集自由生浮游细菌。

5) 将 0.22 μm 孔径聚碳酸酯滤膜置于玻璃砂芯滤芯中央, 用配套滤杯固定并夹紧后, 启动真空泵。当抽滤系统内气压降至 0.02 MPa 后, 添加上一步骤中经 3 μm

孔径滤膜过滤的水样，每张滤膜收集过滤水样的过滤时间不得少于 30 分钟。记录过滤持续时间和过滤水样体积。

- 6) 完成过滤后，取下 0.22 μm 聚碳酸酯滤膜并用铝箔纸包裹，放入无菌的 2 mL 离心管保存。离心管外壁应写明样品编号、过滤时间、过滤体积、滤膜孔径和管内滤膜数量等信息，字迹清晰，且上述信息至少标记两遍防止信息缺失。

四、浮游细菌样品保存与仪器整理：

1. 样品过滤富集完成后，将装有样品的离心管按顺序放置、保存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱，用于后续实验；
2. 为了保证以后实验结果的验证，每份样品过滤收集 3–6 份重复样本；
3. 样品采集、过滤富集、保存等实验操作需要准确、详细地记录于实验记录本上；
4. 玻璃砂芯过滤装置、抽滤瓶应使用超纯水彻底清洗并自然风干，以防止细菌生长污染；
5. 不锈钢无菌过滤器内的存水应及时倒出，并打开过滤器阀门保证空气流通，防止细菌生长和器材生锈。

致谢

感谢国家自然科学基金(91851104, 31370471)、福建省自然科学基金(2019J02016)的资助。

参考文献

1. Xue, Y. Y., Yu, Z., Chen, H. H. Yang, J. R., Liu, M., Liu, L. M., Huang, B. Q., Yang, J. (2017). [Cyanobacterial bloom significantly boosts hypolimnetic anammox bacterial abundance in a subtropical stratified reservoir](#). *FEMS Microbiol Ecol* 93: fix118.
2. Liu, M., Liu, L. M., Chen, H. H. Yu, Z., Yang, J. R., Xue, Y. Y., Huang, B. Q., Yang, J. (2019). [Community dynamics of free-living and particle-attached bacteria following a reservoir. Microcystis bloom](#). *Sci Total Environ* 660: 501–511.