**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](mailto: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**

1. 水深测深仪（Speed Tech, model: SM-5）
2. 多参数水质分析仪（Hach, model: Hydrolab DS5）
3. 采水器（武汉轩仕霖, model: MY-013）
4. 水泵及配套水管、电源（丰远, model: FY-2-48DC）
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）
6. 无油隔膜真空泵（上海亚荣, model: SHZ-III）
7. 抽滤瓶（成都蜀牛, model: GG-17）
8. 超低温冰箱（Thermo, model: ULT1386-5v）
9. 高压灭菌锅（TOMY, model: Sx-500）
10. 5 L量杯（广州锂阁, model: LG01-112-9）
11. 500 ml量筒（Nalgene, model: 3664-0050PK）

**实验步骤**

1. 野外水体样品采集：
2. 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（精确到分钟）、天气和周围环境情况。
3. 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），并确认各连接口是否牢固；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处的水质参数。
4. 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，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，根据研究目的和实际需求选择水层划分方法。
5. 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）。
6. 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。
7. 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。
8. 浮游细菌过滤富集前准备：
9. 离心管、抽滤瓶、滤杯、滤头应提前用高压灭菌锅灭菌（121 °C，30分钟），并使用烘箱（60 °C）烘干。
10. 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。
11. 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。
12. 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 °C，30分钟），并放至室温，经超纯水润洗后再使用。
13. 浮游细菌过滤富集：
14. 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。
15. 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。
16. 浮游细菌整体群落富集：
17. 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。
18. 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。
19. 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。
20. 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 °C，30分钟），并放至室温，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。
7. 浮游细菌样品保存与仪器整理：
8. 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 °C超低温冰箱，用于后续实验；
9. 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；
10. 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；
11. 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；
12. 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**

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 hypolimnelic anammox bacterial abundance in a subtropical stratified reservoir.](https://academic.oup.com/femsec/article/93/10/fix118/4111147) *FEMS Microbiol Ecol* 93: fix118.

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.](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718353105?via%3Dihub) *Sci Total Environ* 660: 501–511.