

未培养微生物的培养方法进展*

范念斯 齐嵘** 杨敏

中国科学院生态环境研究中心, 环境水质学国家重点实验室 北京 100085

摘要 在自然界庞大的微生物资源中, 传统条件下可分离培养的微生物仅占1%, 绝大多数则是尚未在人工条件下获得生长活性的未培养微生物 (Uncultured microorganism). 未培养微生物的难培养在于无法全面掌握它们原位 (*In situ*) 生长的环境信息及在人工条件下的准确复制, 从而阻碍了环境微生物的特性研究和资源开发. 本文详细介绍了目前对未培养微生物原位生长信息的主要认知及限制实现条件, 系统总结了当今未培养微生物的最新培养方法进展. 以新型培养基、高通量和微流控等为代表的各种新型培养装置与技术的应用, 显著提高了未培养微生物的分离及培养效率, 分离出不同环境中的多种未培养微生物, 例如肠道细菌 Ruminococcaceae、浮游细菌 Formosa 和土壤细菌 Candidate *N. defluvii* 等. 分子生物学技术在近十几年快速发展和广泛应用, 特别是通过高通量测序和宏基因组测序, 在基因功能水平上探索微生物代谢途径和生理生化机制的研究, 为快速寻找适宜人工培养条件、规避传统方法的长周期弊端提供了可能. 总之, 新培养技术的出现显著提高了微生物的可培养比例, 基于分子生物学方法的研究结果不仅大大丰富了微生物资源库, 为种群多样性的深入研究及在生态系统中的作用奠定了良好的基础, 更是为今后微生物分离与培养技术的提高指出了明确方向. (图2 参60)

关键词 环境微生物; 未培养微生物; 限制因素; 培养方法; 分子生物学技术
CLC Q93-335 : Q78

Current technical progresses in the cultivation for uncultured microorganism*

FAN Niansi, QI Rong** & YANG Min

Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Beijing 100085, China

Abstract Only 1% of the natural microorganisms can be artificially isolated and cultured. The large quantity of uncultured microorganisms, the microbes that cannot be kept alive in artificial conditions, is therefore a vast reservoir of natural microorganism resources. One of the major obstacles for further research on these uncultured microorganisms lies in understanding the in situ surviving environmental essentials and precisely duplicating them in the lab condition. This article systematically summarizes the limitation of the present knowledge about in situ environment, related research experiences and advances in the decades. The cultured proportion of uncultured microorganisms has improved owing to the new culture methods and facilities advances, represented as novel or modified media, high throughput sequencing and microfluidics. Many uncultured bacteria from various environment were isolated including intestinal bacteria (Ruminococcaceae), bacterioplankton (Formosa) and soil bacteria (Candidate *N. defluvii*). Based on the dramatic progress of molecular biological methodology, particularly gene annotation of amplicon sequencing and metagenome sequencing to reveal the metabolic mechanism, a promising approach was predictable to quickly find suitable culture conditions and avoid the weakness of traditional methods. Therefore, as an effort of new culture technology application, the cultivation of uncultured microorganism is relied on the molecular biological method evolution, which is not only a basic and efficient experimental tool of microbial diversity and ecosystem researches, but also illustrate the direction of coming isolation and cultivation.

Keywords environmental microorganism; uncultured microorganism; limiting factor; cultivation method; molecular biological technology

自然环境中存在着大量的微生物, 其数量高达 10^6 种, 迄今依靠传统纯培养方法能够分离培养的微生物约占总数的1.0%, 而原核生物仅为0.1%^[1]. 据国际原核生物分类学委

员会 (International Committee on Systematics of Prokaryotes) 2014年的报告显示, 自平板培养技术应用以来, 仅有未超过11 000种原核生物被发现. 未培养微生物的概念起初是由 Colwell等^[2]在1982年提出, Felske等^[3]于1997年将能够通过分子生物学方法检测到, 但未能在人工条件下获得纯培养的微生物定义为“至今未培养微生物”, 包括已获纯培养, 但在常规实验室环境条件下难于生长、处于休眠状态下的微生物.

收稿日期 Received: 2015-09-29 接受日期 Accepted: 2015-10-28

*国家自然科学基金项目 (51378489、31170468) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (51378489, 31170468)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: qirong@rcees.ac.cn)

不同环境中微生物的可培养率有所不同: 土壤中~0.3%, 海洋环境中0.001%-0.1%, 淡水环境中~0.25%, 沉淀物中~0.25%, 活性污泥中1%-15%^[4]。以上数据不难发现, 未培养微生物的难培养性在于其原位生长 (*In situ*) 环境信息的获取以及在人工环境下的准确模拟, 包括优势摄入基质、共生种群等对其生理生化过程影响等重要的边界条件^[5]。在过去的30年中, 细菌16S rRNA基因文库构建和序列分析、变性梯度凝胶电泳 (Denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)、荧光原位杂交 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、DNA芯片技术、高通量测序、宏基因组学等分子生物学技术成为解释微生物多样性的巨大推动力, 许多新的物种通过16S rRNA测序和宏基因组等分子生物学方法被发现^[6-7], 从而使人们更加明确地了解可培养微生物与已被鉴定的微生物之间的差距 (图1)。这不仅大大丰富了微生物的多样性数据, 同时也从遗传物质的角度提供了自然环境中微生物的生理生化等功能信息, 使我们更加清晰地认识到未培养微生物不仅蕴含着丰富的基因、系统发育学和生态学信息, 更是人类亟待开发利用的庞大生物能源库。

分析技术的进步并不能一蹴而就地解决目前存在的所有问题, 如GenBank中的现有基因大多数没有明确的功能注释, 无法准确地了解单一微生物在环境中的生理代谢特性, 无法为获取目标微生物的可培养提供足够的信息支持。分子水平的生物学信息限制了种群水平上微生物形态、代谢途径及其在环境中作用的深入研究。因此, 在分子生物学技术持续发展的同时, 仍需不断开发新的微生物培养技术, 不仅增加可培养微生物在环境中的比例, 更重要的是为理解微生物在环境中的行为与功能, 实现微生物资源的利用与扩大化奠定扎实的理论科学与科学基础。本文从难培养微生物生长的限制因素出发, 就目前有关新型微生物培养策略进行简要的概述, 着重讨论各个方法的优劣对比和对微生物培养及生理学研究进展的创新意义。

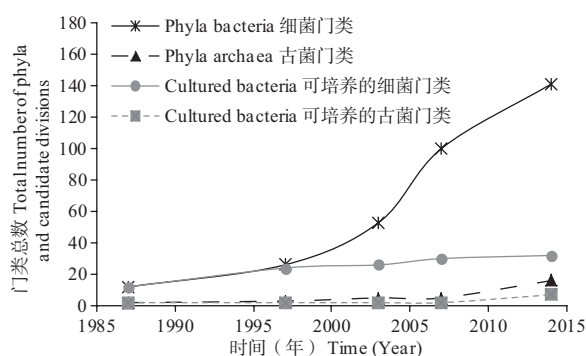


图1 1987-2014年间细菌和古菌的门类数量^[8]。2007年和2014年的数据选自GOLD数据库^[9]。

Fig. 1 The phylum number of bacteria and archaea during 1987-2014^[8]. Data for 2007 and 2014 were extracted from the GOLD Genomes OnLine Database^[9].

1 不可培养微生物的限制因素

由于生境条件的改变, 多数环境微生物在实验室人工条件培养时, 因无法适应而进入一种“活的非可培养状态”

(Viable but nonculturable, VBNC), 即维持一定代谢功能但并不生长繁殖, 最终甚至死亡。因此, 未培养微生物的限制因素主要是由于对目标微生物生理代谢途径的认识不足, 从而无法选择其真实的最佳生长培养条件。

1.1 生长速率较低, 检测技术不敏感

可培养微生物的最终形态往往是在人工条件下形成肉眼可见的聚集生长状态——菌落。在实验室培养条件下, 传统培养基上能形成可见菌落的微生物往往能够大量优先摄取培养基中可直接被吸收利用的营养成分、将较多能量用于生殖、依赖高繁殖率的r生长策略者。它们可以较快形成较大菌落或菌群, 而生长缓慢的微生物却因养分限制因素无法形成菌落。同时还有一些生存在寡营养环境下的微生物仅以表面迁徙生长或扩散生长的形式在培养基中存活, 在显微镜下可观察到几个细胞组成的小型集合^[10], 而常规的计数法和比浊法都不能鉴定其生长。

1.2 培养基质的富营养化

培养基中普遍含有琼脂、蛋白胨、酵母等易被生物利用与降解的营养物质, 但自然界中大多数微生物生存在缺少丰富营养来源的环境下, 长期处于中低营养甚至是“贫营养”状态。如海洋环境中的专性寡营养微生物, 其具有高效的营养吸收机制, 生存环境的有机碳水平仅为mg/L水平^[11], 属于典型的对环境资源高亲和性的K生长策略者。将这类嗜寡微生物置于营养丰富的人工培养基时, 突然的极度营养变化会凸现其基因型的固有缺陷, 因高浓度营养基质的抑制而停止生长^[12]。例如多数海洋微生物都具有高效的丙氨酸运输系统^[13], 但是缺乏一些关键的代谢中间产物 (如丁二酸), 若为这类生物提供富营养的培养环境反而会制约其复苏和生长, 严重还会导致死亡^[14]。

此外, 适应能力较强的微生物早期会迅速生长, 在代谢过程中产生大量的、微生物自身难以调节的过氧化物、超氧化物或羟基自由基等毒性物质, 该类物质的过量积累会破坏微生物细胞的内膜结构, 同时启动一些如SOS等应激机制进行微生物的自我修复。然而, 对于适应能力较差或未及时修复的微生物会因受到毒害作用而处于休眠状态, 乃至死亡, 从而表现出微生物的不可培养性^[15]。

1.3 对微生物之间互作关系的忽视

自然环境下微生物种群关系复杂繁多, 当微生物从天然生境突变到人工培养条件时, 种间信息交流会发生根本性的改变。共生关系是自然界中普遍存在的重要生存模式之一。当共生两者间距离较远, 其生长所需的促进因子会相应缺乏, 导致互作生物不能正常生长, 从而呈现难以培养状态。同时环境微生物之间广泛存在群体感应 (Quorum sensing) 关系, 指细菌能够通过感应特定信号分子来调控特定基因表达, 例如抗生素合成^[16]、调控固氮基因、接合转移Ti质粒^[17]、表达毒性因子^[18]、合成胞外多糖、细菌群落和丛集^[19]、进入稳定期以及形成生物膜^[20], 以调节群体行为来应答周围环境的变化。当微生物群体浓度低时, 细胞分泌的信号分子浓度低, 这些信号在胞外迅速扩散并立即被稀释, 细胞保持静默状态, 无法达到阈值并发出受体调节信号, 从而无法高效抵御外界环境压力, 实现个体的自我保护及生长。由于人们目前尚未对环境微生物种间复杂的互作机制进行系统的研究, 因

此直接采用传统培养技术极易将微生物之间的共生关系和信息传递阻隔,且无法还原,导致微生物的不可培养甚至死亡。

1.4 原生态环境的不可复现

除了营养源和种间互作以外,影响微生物生长的重要因素还包括温度、pH值、紫外线和氧气环境等外界因子。有些极端环境,如火山喷发口、深海热液喷口(350-400 °C, 80-500 MPa)等,是目前人工无法模拟和复现的。同时特定细胞在有氧和缺氧环境中会进行不同的代谢途径,利用不同的应激酶和转化酶来完成细胞呼吸,当周围环境中的氧气浓度超过其生长条件范围,微生物会因缺少具有活性的促进因子无法进行正常的呼吸和生理代谢而变为未培养菌。据Simona等人的研究,丝状菌*Microthrix parvicella* RN1厌氧阶段在体内优先储存长链脂肪酸(LCFA,如三酰甘油),而在好氧阶段降解LCFA形成终产物海藻糖。但其全基因组测序结果显示其并没有能够表达海藻糖转运蛋白的片段,因此该类丝状菌无法将体内累积的海藻糖运输至胞外,只能利用海藻糖进行内部循环代谢^[21]。而常规培养方法无法创造严密的厌好交替过程及比例条件,使得该类细菌成为活的非可培养状态(VBNC)。极端温度、pH值波动、紫外照射、溶氧波动和缺乏必需的营养物质均有可能导致细菌进入活的非可培养状态^[22]。另一方面,实验室纯培养很难提供潜在的重要因子。如海水和淡水微生物的直接能量来源三磷酸腺苷(ATP)浓度高达1 nmol/L,然而在海洋环境中游离的可被直接利用的ATP很少,因此能量很有可能源自于生境中的浮游植物或其他生物;一些水生细菌离不开藻类分泌的生长因子和微量元素。此外,动植物病原菌和宿主之间存在的寄生关系都是纯培养条件下难以实现的^[23]。

2 未培养微生物培养方法的开发与应用

针对传统分离培养方法的先天偏向性、筛选产物多为富营养环境优势菌种等缺陷,研究者在生长速率、营养源、原生境条件、种间互作等多方面进行了培养装置及策略的改良,在一定程度上提高了未培养微生物的可培养性。

2.1 常规培养方法的改善

2.1.1 培养基的优化与调整 适当稀释的培养基同样有利于寡营养微生物的分离培养。Nikki等在2011年将改良后的厌氧培养基进行稀释,从反刍动物的胃里分离培养出14个潜在新属27株细菌^[24]。添加非传统的碳源、微量元素和电子供体或受体后,2014年Rettedal等分离了人体肠道内微生物,其中培养基中添加了不同碳源和多种复杂小分子化合物,增加了少量维生素混合物、微量元素混合物和糖类混合物等非常规微生物生长因子^[25]。此外,研究者们还开发利用了新型微生物胞外多糖作为培养基凝固剂,其即是潜在营养源又对微生物没有毒害作用,最终成功分离出新种*Oscillibacter*并进行测序与表型分析,为丰富人体肠道微生物多样性提供有利基础。

短肽类物质有促进细菌生长的作用。Nichols等通过在普通培养基中添加五氨基酸的短肽LQPEV从海洋砂坪中分离得到了MSC33类型的未培养细菌^[26]。一株未可培养的光合

细菌*Rhodospseudomonas palustris*在含有高丝氨酸内酯(Acyl-HSL)的培养基中被分离培养出来。由于HSL作为一类新的群体感应信号分子能够和特定信号受体结合并调控目标基因的表达,有利于细胞间沟通的信号物质,改善了微生物的培养状况^[27]。除了在培养基内添加信号分子外,一些能够降低有害物质的影响因子和促进生长的有益因子同样可以提高微生物的可培养率^[28]。

除添加特殊物质以外,交互共生培养法(Cross-feeding cultivation)也是基于相似机理的一种培养方法。Egan等人发现*Bifidobacterium breve* UCC2003只有与*B. bifidum* PRL2010共生培养于含有粘蛋白的培养基上才能表现生长^[29]。而结合高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测(High-performance anionic exchange chromatography-air pulsing ampere detectors, HPAEC-PAD)及转录组分析结果显示,*B. breve* UCC2003自身基因组内因并不含有能够表达黏蛋白降解酶的相似序列,同时细胞表面也不存在相应的转运蛋白;而*B. bifidum* PRL2010恰巧能够降解黏蛋白并产生多种单糖和多糖,可以作为促进*B. breve* UCC2003的快速生长的碳源。根据两者共生情况研究结果,即使黏蛋白衍生的碳水化合物不足时,两者也不存在竞争关系,因此,这种互惠共生的关系在难培养菌的培养方面具有重要的参考价值。

2.1.2 培养条件的优化 对培养条件的优化可以大幅度提高未培养微生物的培养机率。若在合适的培养基上延长培养时间至3个月,可形成肉眼可见的菌落^[30]。通过对环境样品的稀释以降低优势微生物的原始比例也可以达到使寡营养微生物顺利分离的目的。Richard等先将藻华水样稀释了10倍作为母液,再将其继续稀释不同倍数进行培养,共分离筛选出了3株极易引起藻华的浮游细菌*Formosa*、*Polaribacter*和*Reinekea*,并结合流式细胞仪和酶联荧光原位杂交(Catalyzed reporter deposition fluorescent *in situ* hybridization, CARD-FISH)计量方法证实了稀释培养法(Dilution culture)有助于分离培养寡营养微生物^[31]。自然界中很多微生物呈聚集生长,形成絮体或颗粒,致使内部微生物不易接触培养基,适度的超声处理可将微生物分散,使菌团内部细胞充分接触并利用培养基而得到培养^[32]。

2.2 微囊包埋技术

微生物包埋技术也称为凝胶微滴培养法、单细胞封装培养法。Zenglar等在2005年提出了利用凝胶包埋技术对环境中的单个微生物细胞进行包埋,结合流式细胞仪进行高通量分离培养^[33]。将原位样品稀释到一定浓度后与融化的琼脂糖混合,乳化并形成直径为30-50 μm的微滴即微滴胶囊(Microdroplets, MDS)。然后将其装入用0.1 μm滤膜及8 μm滤膜封口灭菌的凝胶层析柱中,利用补充少量微量元素的低浓度培养液进行连续流态培养。再结合流式细胞仪检测,将包裹单个菌落的胶囊分选至含有丰富培养基的96孔板中继续培养,最终获得纯培养微生物。尽管微生物被独立包裹在微滴内,但微滴孔径较大,是一个开放连续补充营养的微系统,能够良好地模拟自然环境中的生存条件,在有效缩短微生物初始低生长率时间的同时还保证了微生物生长的单一性,易于微生物的分离纯化。

自此,细胞微囊包埋技术被广泛应用于未培养微生物

的分离培养领域, Zengler的凝胶微滴培养法^[34]也于2014年被收录于《Springer Protocols Handbooks》. 而在此基础上, Fujitani等利用前向角散射 (FSC) 和侧向散射 (SSC) 结合的方式从富集样品中分离得到了3株硝化螺菌属中未可培养菌种Candidate *N. defluvii*、*Nitrospira* sp. clone 2和*Nitrospira* sp. clone OWP^[35]. 与传统的细胞分选机制依赖于细胞本身的光散射和荧光特征进行分离不同, 前向角散射光的强度与细胞的体积有关, 对同种细胞群体随着细胞截面积的增大而增大, 而侧向散射光对细胞内部结构 (如细胞膜、胞质、核膜) 的折射率更为敏感, 这种改进方法既能保证培养条件, 又规避了种间竞争的影响. 但该方法建立的时间较短、技术还不够成熟, 如包埋基质透性差、微生物热敏感等问题尚未解决^[36], 对于一些容易与种外微生物共生的细菌, 其后续纯化培养的条件和方法还需要继续探索.

2.3 微流控芯片技术

微流控芯片技术 (Microfluidics) 是指在微观尺寸下控制、操作和检测复杂流体的技术. Jeong-Yeol Yoon等在2012年就利用微流体芯片感应器 (Lab-on-a-chip sensor) 检测食品中病原菌^[37]. 陈炯等人于2014年通过应用微流体芯片技术检测食源性致病菌^[38]. 实验结果显示, Lab-on-a-chip方法对于4种食源性致病菌的特异性分别达到100%、100%、96.7%、100%. 随着微流体芯片技术的不断发展和完善, Liang Ma等采用靶向微流控培养技术 (Gene-targeted microfluidic cultivation) 分离出人类微生物组项目 (Human microbiome project, HMP) 中最希望获得的人类肠道微生物Ruminococcaceae^[39]. 其操作主要流程如图2: 首先通过微管道将临床样品在3200孔的微流体设备上随机分配以抑制优势菌的快速生长; 在不同芯片设置不同培养条件的基础上, 芯片洗脱技术 (“Chip wash” method) 用于检测微生物的微流体芯片上的生长情况并收集不同条件培养后的微菌落; 根据PCR测序结果判断是否培养出目标菌种, 若不存在目标物则改善条件后重复操作直至目标出现; 将目标微群落芯片设备平分在两个微孔培养板上, 其中一份用于检测目标菌所在位置, 另一份用于分离目标菌并进行扩大培养.

微流控芯片技术具有液体流动可控性、样品和试剂消耗极少、分析速度显著提高且成本大大降低等特点, 能够在短时间内同时进行上百个样品的快速分析, 并且可以在线控制样品的预处理及全过程分析. 它不仅能够通过高通量测序同时检测多种不可培养微生物的存在, 还能获得目标微生物的纯培养物, 为后续的生理生化特征分析提供必要条件.

2.4 高通量培养技术

为了提高未培养生物体的分离效率, 以尽可能接近目标微生物原始自然生存环境的新方法和新装置不断被开发, 高通量培养技术作为其中的代表, 具有较大的发展潜力. Colin在Collado的绝迹稀释法 (Dilution-to-extinction method)^[41]的基础上提出了高通量培养法 (High-throughput culturing, HTC)^[40]: 将河口底泥样品稀释至痕量后, 采用384微孔细胞培养板分离疏还原菌, 同时采用16S rRNA克隆文库的方法比对疏还原菌的多样性. 结果显示, 两种不同生物方法分别得到22和60个操作分类单位 (Operational taxonomic units, OTUs) 且少有重复, 存在互补关系. 两年后, Colin等又在

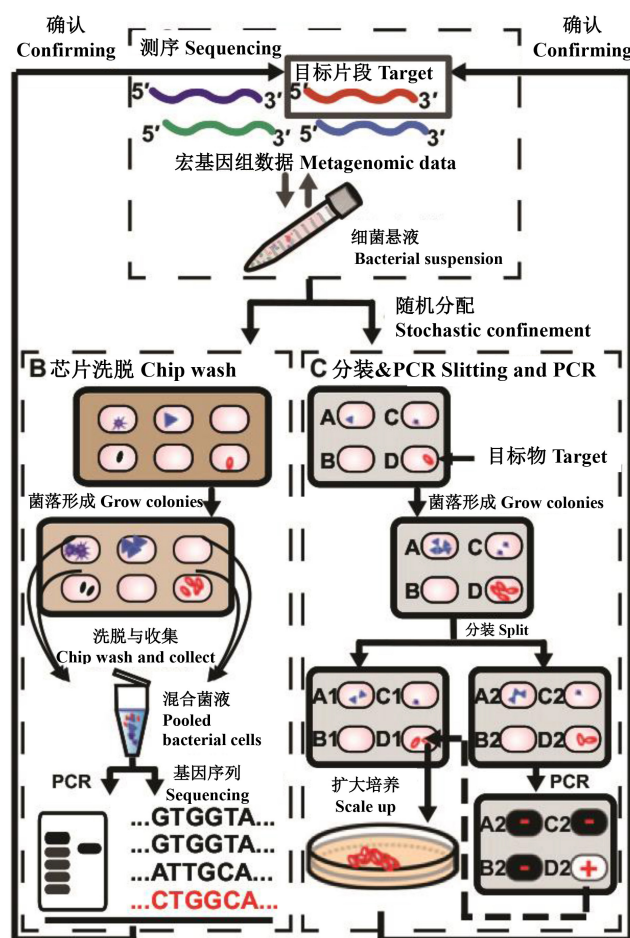


图2 靶向微流体培养流程^[39].

Fig. 2 Procedures of gene-targeted microfluidic cultivation^[39].

同培养条件下富集培养了底泥样品, 同样采用高通量培养技术获得了更多疏还原菌的纯培养物^[42]. 该技术能够同时操作多个培养单元, 在短期内检测出大量的微生物, 大大提高了微生物的培养效率和分离新种的可能性.

3 分子生物学方法在开发未培养微生物中的应用

随着环境中微生物DNA提取方法的不断改进和完善^[43], 以核酸为基本信息的微生物分类、功能和进化研究方法获得了较大发展. 分子生物学方法被广泛应用于未可培养微生物的探索研究, 如16S rRNA基因克隆文库在一定程度上加深对不可培养微生物的多样性认识; 而功能基因更侧重于目标微生物的生理代谢及生态体系的贡献研究^[44]. 近年来迅速发展起来的宏基因组学, 在两种方法的基础上研究目标微生物的多样性结构和功能基因组, 探知未培养微生物中的天然产物以及处于“沉默”状态天然产物. 它不依赖于微生物的分离与培养, 因而减少了由此带来的瓶颈问题, 是一条寻找新基因及其代谢产物的新途径. 同时通过基因数据库和基因注释信息的不断丰富, 人们可以快速地缩小目标微生物的优势生长边界条件, 更为准确地进行分离与培养.

宏基因组 (Metagenome) 由 Handelsman 等于 1998 年^[45] 提出, 其定义为 “the genomes of the total micro biota found in nature”, 即生境中全部微生物遗传物质的总和, 既包含可培养微生物和未培养微生物的遗传信息, 又规避了纯培养方法的周期长、易污染等种种弊端, 极大地拓展了微生物资源的利用空间。Albertsen 等人利用微分覆盖聚类法从活性污泥反应器 DNA 样品的多重宏基因组信息中拼装出 31 株细菌的基因组, 其中有 12 株细菌已经拼装出全基因组, 包含了未培养的候选菌门 TM7 中的 4 株代表性细菌 (相对丰度 0.06%-1.58%)^[46]。根据宏基因组提供的功能基因信息, TM7 的代谢途径、细胞壁形态特征和系统分类地位也逐渐清晰, 这些信息不仅丰富了未可培养微生物基因资源库的多样性, 为后续具有针对性的特殊培养基的设计也提供有效信息, 缩小了培养基重要组分的选择范围。

有别于宏基因组学这类能够分析种群集合基因组的分子生物学手段, 单细胞基因组测序技术则是能够在单个细胞的水平上, 对全基因组进行扩增与测序的一项新技术^[47-48], 不仅能够通过对高覆盖率的完整基因组的测序揭示细胞群体差异和细胞进化关系, 还能获取未培养微生物的遗传信息, 具有广阔的应用前景^[49]。单细胞测序技术的关键步骤在于单细胞分离、细胞溶解与获取全基因组扩增测序。单细胞分离技术多种多样, 例如荧光激活细胞分选术 (Fluorescence-activated cell sorting) 和微流控技术^[50-52]。细胞溶解后获得的匹克级的 DNA 需要进一步全基因组扩增以提高其总量达到纳克或微克级, 为后续单细胞全基因组测序提供必要前提。Marshall 和 Pamp 等人将 4 种以上亲缘关系较近的单细胞测序数据进行混合拼装后, 显著提高了拼接结果的可分析性, 能够组装出序列重叠群也 longer^[53-54]。此外, 将宏基因组数据补充到单细胞数据中不仅有利于序列拼装, 还能从个体与种群的层面上建立单个细胞基因组和种群基因组之间的联系^[55]。Embree 等采用单细胞和宏基因组技术相结合的方法获得一株未培养细菌 OP9 的全基因组序列, 并对其进行系统发育分类鉴定, 发现并建立该菌株与另一类产纤维素嗜热菌群的进化关联^[56]。基于基因组学提供的代谢机制和互作信息, 设计适宜目标微生物的培养条件远比单一依靠富营养培养基分离筛选更加具有目的性, 大大提高了未培养微生物的培养效率。

从未培养微生物的基因组信息中挖掘其潜在营养物质需求有利于快速寻找合适的培养条件。SAR11 进化枝是从海洋非自养细菌中检测到的一类常见分枝, 自 2002 年, 研究者对这类微生物种群的了解仅限于环境样品测序结果中的基因片段^[57]。随后, Rappé 等人用营养物质和过滤灭菌海水的混合液分离到了 SAR11, 但是其生长极其缓慢, 可培养生物量很少^[58]。经过宏基因组数据分析显示该细菌缺少同化硫酸盐还原基因, 需要外源的还原性硫来促进其生长, 例如蛋氨酸和二甲基巯基丙酸内盐 (DMSP)。在海洋环境中, DMSP 主要由其他浮游生物产生, 将这种物质添加至 SAR11 的培养基中, 极大的提高了该细菌的纯培养生物量^[59]。Simon 等人也通过对 *M. parvicella* strain RN1 纯培养菌株的宏基因组测序构建出完整的代谢通路图, 从中发现 *M. parvicella* 能够利用长链脂肪酸作为碳源以提高其在特殊环境下的种群竞争力^[21], 该

结论随后也在实际工程中得到了验证^[60], 提高了快速获得难培养微生物 *M. parvicella* 的可能性。因此, 通过分子生物学技术解析未培养微生物的代谢途径和机制, 为未培养微生物的可培养条件提供重要依据。

这类分子生物学技术为未可培养微生物的研究提供了一个全新的研究思路, 目前研究者利用这一技术已经对地球上的多种极端生境进行了研究, 并取得了很多新的成就。该方法虽然不能直接获得难培养菌的纯培养物, 但其丰富的测序结果为培养条件的探索提供了有效信息, 避免了盲目筛选。分子生物学方法不仅极大丰富了微生物的多样性, 还可在短期内获得目标微生物在分子水平上的信息, 大大提高了研究效率。但这并不意味着传统微生物培养技术被淘汰, 只有把两种技术有效结合, 取长补短, 才能更深入地揭示蕴藏在未培养微生物中的可供人类开发利用的直接的和潜在的生物资源。

综上所述, 近年来新型的微生物培养方法大致可以归为三类: 一类是在传统平板培养法的基础上, 改良培养基组分及优化培养条件, 例如添加微量元素及信号分子, 提供电子受体和供体, 降低营养物质浓度, 改变培养温度、pH 或时间等, 通过特异性的培养基和培养条件从复杂体系中分离筛选目标微生物; 另一类是模拟原生境的新型技术及设备, 诸如高通量培养, 生物芯片, 微滴培养板和微流控技术等。这些技术不仅能够提供相对接近自然环境的培养条件, 还能同时少样多量地分离目标微生物, 在很大程度上提高分离培养的效率, 也极大丰富了微生物多样性资源, 并为后续的开发利用奠定了良好的研究基础。最后, 现代分子生物学技术的发展为研究未培养微生物的多样性和群落动态变化提供了有力工具, 增加了人们对环境样品中未培养微生物了解的真实性和准确性, 从基因水平上总结边界条件下优势群落和种群的信息, 快速缩短未培养菌的培养周期。每种技术各有优势和局限性, 在今后的发展中要根据不同样品选择适合的方法, 采用多种方法联合使用、传统培养与新兴技术相结合的方式, 相互补充和完善, 不断提高检测技术的灵敏度和准确性。

4 小结与展望

到目前为止, 人类能够培养出的微生物总数不及环境中的 1%, 随着分子生物学技术的应用, 微生物多样性不断被更新, 但是不可培养微生物的培养方法仍然存在许多局限性。尽管我们已经在微生物培养方法上取得一些进展, 由于微生物生存环境的复杂性, 未培养微生物数量庞大、种类繁多, 在探索微生物多样性及可培养性的过程中仍面临着巨大挑战。早在 2009 年 Alain K 等就提出未来微生物培养的研究方向^[1]: 设计出添加微量元素、促进因子、信号分子等的优化培养基, 在模拟自然环境时, 保证微生物之间的相关性; 以及有利于微生物互作的高通量群体培养装置, 有效地获得共生或协作的微生物, 是今后可培养性研究的发展趋势。分子生物学方法的发展和利用在一定程度上弥补了因传统培养技术不足导致的微生物多样性信息匮乏的现状, 但目前许多研究只停留在对分离得到的微生物进行鉴定、分类和基因注释

的层面上,并未针对未培养菌的可培养机理进行深入研究,只有建立未培养微生物的可培养机制才能更有目的地对不同类型未培养微生物进行大量的开发利用,构建更完善的微生物多样性进化库。

总之,由于微生物群落特征和复杂的生存环境,旨在提高未培养微生物的可培养率不能仅依靠某一种或者一类方法,而应综合多方面信息,采用更为高效的技术手段。对细菌培养问题应综合考虑:在培养基中少加营养物,添加群体感应调节化合物;相对延长培养时间;保护细胞不受外源性物质的破坏;利用高效、仿原生境的分离手段等。在发展微生物培养新技术的同时,新型微生物培养技术的开发还应紧密结合相关的分子生物学技术,可以在更大程度上能够克服传统纯培养技术的不足,是一条探索未培养微生物的新途径。与其他学科的理论知识相结合能够更好的帮助研究者了解微生物,设计尽可能接近微生物原生境的培养环境,拓展微生物的可培养性,争取培养出更多的未培养微生物。

参考文献 [References]

- Alain K, Querellou J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges [J]. *Extremophiles*, 2009, **13** (4): 583-594
- Xu HS, Roberts N, Singleton F, Attwell R, Grimes D, Colwell R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment [J]. *Microbial Ecol*, 1982, **8** (4): 313-323
- Felske A, Rheims H, Wolterink A, Stackebrandt E, Akkermans AD. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils [J]. *Microbiology*, 1997, **143** (9): 2983-2989
- Stackebrandt E, Embley TM. Diversity of Uncultured Microorganisms in the Environment [M]. New York: Springer US, 2000: 57-75
- Newman DK, Banfield JF. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems [J]. *Science*, 2002, **296** (5570): 1071-1077
- Narihiro T, Kamagata Y. Cultivating yet-to-be cultivated microbes: the challenge continues [J]. *Microb Environ*, 2013, **28** (2): 163-165
- Ravin N, Mardanov A, Skryabin K. Metagenomics as a tool for the investigation of uncultured microorganisms [J]. *Rus J Gen*, 2015, **51** (5): 431-439
- Achtman M, Wagner M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, **6** (6): 431-440
- Reddy T, Thomas AD, Stamatis D, Bertsch J, Isbandi M, Jansson J, Mallajosyula J, Pagani I, Lobos EA, Kyrpides NC. The Genomes OnLine Database (GOLD) v. 5: a metadata management system based on a four level (meta) genome project classification [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, **43**: 1-8
- Simu K, Hagström Å. Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70** (4): 2445-2451
- 王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, **40** (1): 6-17 [Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms [J]. *Microbiol China*, 2013, **40** (1): 6-17]
- 田甜, 李冬梅, 戴世鲲, 殷克东, 孙慧敏, 李翔. 海洋环境中难培养微生物的寡营养培养[J]. 微生物学通报, 2009, **36** (7): 1031-1039 [Tian T, Li DM, Dai SK, Yin KD, Sun HM, Li X. Culture methods of the oligotrophic marine microbes [J]. *Microbiology*, 2009, **36** (7): 1031-1039]
- Ostrowski M, Fegatella F, Wasinger V, Guilhaus M, Corthals GL, Cavicchioli R. Cross-species identification of proteins from proteome profiles of the marine oligotrophic ultramicrobacterium, *Sphingopyxis alaskensis* [J]. *Proteomics*, 2004, **4** (6): 1779-1788
- Schut F, Vries EJ, Gottschal JC, Robertson BR, Harder W, Prins RA, Button DK. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59** (7): 2150-2160
- Cho JC, Giovannoni SJ. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70** (1): 432-440
- Pierson L, Keppenne VD, Wood DW. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density [J]. *J Bacteriol*, 1994, **176** (13): 3966-3974
- Zhang L, Murphy PJ, Kerr A, Tate ME. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones [J]. *Nature*, 1993, **362**: 446-449
- Lesprit P, Faurisson F, Lambert OJ, Thoraval FR, Foglino M, Vissuzaine C, Carbon C. Role of the quorum-sensing system in experimental pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in rats [J]. *Americ J Respir Crit Care Med*, 2003, **167** (11): 1478-1482
- Eberl L, Winson MK, Sternberg C, Stewart GS, Christiansen G, Chhabra SR, Bycroft B, Williams P, Molin S, Givskov M. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens* [J]. *Molec Microbiol*, 1996, **20** (1): 127-136
- Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg E. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms [J]. *Nature*, 2000, **407** (6805): 762-764
- McIlroy SJ, Kristiansen R, Albertsen M, Karst SM, Rossetti S, Nielsen JL, Tandoi V, Seviour RJ, Nielsen PH. Metabolic model for the filamentous 'Candidatus *Microthrix parvicella*' based on genomic and metagenomic analyses [J]. *ISME J*, 2013, **7** (6): 1161-1172
- Trevors J. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells [J]. *J Microbiol Meth*, 2011, **86** (2): 266-273
- Sanmee R, Lumyong P, Dell B, Lumyong S. *In vitro* cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand [J]. *Mycoscience*, 2010, **51** (1): 15-22
- Kenters N, Henderson G, Jeyanathan J, Kittelmann S, Janssen PH. Isolation of previously uncultured rumen bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium [J]. *J Microbiol Meth*, 2011, **84** (1): 52-60
- Rettedal EA, Gumpert H, Sommer MO. Cultivation-based multiplex phenotyping of human gut microbiota allows targeted recovery of previously uncultured bacteria [J]. *Nat Commun*, 2014, **5**: 1-9
- Nichols D, Lewis K, Orjala J, Mo S, Ortenberg R, O'Connor P, Zhao C, Vouras P, Kaerberlein T, Epstein SS. Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow *in vitro* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74** (15): 4889-4897

- 27 Hirakawa H, Tomita H. New class of Acyl-homoserine lactone quorum sensing signals [J]. *Japan J Bacteriol*, 2012, **68** (4): 325-335
- 28 曾建民, 曾振顺, 原红娟, 谭志远. 难培养微生物培养方法的研究进展 [J]. 生物技术进展, 2012, **2** (3): 165-170 [Ceng JM, Ceng ZS, Yuan HJ, Tan ZY. Advances in culture methods of oligotrophic microbes [J]. *Curr Biotechnol*, 2012, **2** (3): 165-170]
- 29 Egan M, Motherway MOC, Kilcoyne M, Kane M, Joshi L, Ventura M, Sinderen D. Cross-feeding by *Bifidobacterium breve* UCC2003 during co-cultivation with *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in a mucin-based medium [J]. *BMC Microbiol*, 2014, **14** (1): 282
- 30 Stott MB, Crowe MA, Mountain BW, Smirnova AV, Hou S, Alam M, Dunfield PF. Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand [J]. *Environ Microbiol*, 2008, **10** (8): 2030-2041
- 31 Hahnke RL, Bennke CM, Fuchs BM, Mann AJ, Rhie E, Teeling H, Amann R, Harder J. Dilution cultivation of marine heterotrophic bacteria abundant after a spring phytoplankton bloom in the North Sea [J]. *Environ Microbiol*, 2015, **17** (10): 3515-3526
- 32 Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, Taylor PM, Sait M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (5): 2391-2396
- 33 Zengler K, Walcher M, Clark G, Haller H, Toledo G, Holland T, Mathur EJ, Woodnutt G, Short JM, Keller M. High-throughput cultivation of microorganisms using microcapsules [J]. *Meth Microbiol*, 2005, **397**: 124-130
- 34 Zengler K, Behrendt L. Protocols for High-Throughput Isolation and Cultivation [M]. New York: Humana Press, 2014: 1-9
- 35 Fujitani H, Ushiki N, Tsuneda S, Aoi Y. Isolation of sublineage I *Nitrospira* by a novel cultivation strategy [J]. *Environ Microbiol*, 2014, **16** (10): 3030-3040
- 36 Long Q, Liu X, Yang Y, Li L, Harvey L, McNeil B, Bai Z. The development and application of high throughput cultivation technology in bioprocess development [J]. *J Biotechnol*, 2014, **192**: 323-338
- 37 Yoon JY, Kim B. Lab-on-a-chip pathogen sensors for food safety [J]. *Sensors*, 2012, **12** (8): 10713-10741
- 38 陈炯, 屠丽红, 陈艳新, 秦胜营. 微流体芯片技术检测食源性致病菌的应用研究 [J]. 上海预防医学, 2014, **26** (6): 330-335 [Chen J, Tu LH, Chen YX, Qin SY. Lab-on chip for the detection of food borne pathogenic bacteria. *Shanghai J Prevent Med* [J], 2014, **26** (6): 330-335]
- 39 Ma L, Kim J, Hatzenpichler R, Karymov MA, Hubert N, Hanan IM, Chang EB, Ismagilov RF. Gene-targeted microfluidic cultivation validated by isolation of a gut bacterium listed in Human Microbiome Project's Most Wanted taxa [J]. *Proc Nation Acad Sci*, 2014, **111** (27): 9768-9773
- 40 Colin Y, Goñi-Urriza M, Caumette P, Guyoneaud R. Combination of high throughput cultivation and *dsrA* sequencing for assessment of sulfate-reducing bacteria diversity in sediments [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2013, **83** (1): 26-37
- 41 Collado J, Platas G, Paulus B, Bills GF. High-throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, **60** (3): 521-533
- 42 Colin Y, Goñi-Urriza M, Caumette P, Guyoneaud R. Contribution of enrichments and resampling for sulfate reducing bacteria diversity assessment by high-throughput cultivation [J]. *J Microbiol Meth*, 2015, **110**: 92-97
- 43 Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** (2): 316-322
- 44 Donachie SP, Foster JS, Brown MV. Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity [J]. *ISME J*, 2007, **1** (2): 97-102
- 45 Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. *Chem Biol*, 1998, **5** (10): 245-249
- 46 Albertsen M, Hugenholtz P, Skarshewski A, Nielsen KL, Tyson GW, Nielsen PH. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, **31** (6): 533-538
- 47 Blainey PC, Quake SR. Dissecting genomic diversity, one cell at a time [J]. *Nat Meth*, 2014, **11** (1): 19-21
- 48 Stepanauskas R. Single cell genomics: an individual look at microbes [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2012, **15** (5): 613-620
- 49 董燕, 宋程程, 黄鹤. 单细胞测序技术研究进展 [J]. 化学工业与工程, 2015, **32** (1): 71-78 [Dong Y, Song CC, Huang H. Advances in single cell sequencing [J]. *Chem Ind Eng*, 2015, **32** (1): 71-78]
- 50 Landry ZC, Giovanonni SJ, Quake SR, Blainey PC. Optofluidic cell selection from complex microbial communities for single-genome analysis [J]. *Meth in Enzymol*, 2013, **531**: 61-90
- 51 Rinke C, Lee J, Nath N, Goudeau D, Thompson B, Poulton N, Dmitrieff E, Malmstrom R, Stepanauskas R, Woyke T. Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics [J]. *Nat Prot*, 2014, **9** (5): 1038-1048
- 52 Blainey PC. The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2013, **37** (3): 407-427
- 53 Marshall IP, Blainey PC, Spormann AM, Quake SR. A single-cell genome for *Thiovulum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, **78** (24): 8555-8563
- 54 Pamp SJ, Harrington ED, Quake SR, Relman DA, Blainey PC. Single-cell sequencing provides clues about the host interactions of segmented filamentous bacteria (SFB) [J]. *Gen Res*, 2012, **22** (6): 1107-1119
- 55 Blainey PC, Mosier AC, Potanina A, Francis CA, Quake SR. Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis [J]. *PLoS ONE*, 2011, **6** (2): 1-12
- 56 Embree M, Nagarajan H, Movahedi N, Chitsaz H, Zengler K. Single-cell genome and metatranscriptome sequencing reveal metabolic interactions of an alkane-degrading methanogenic community [J]. *ISME J*, 2014, **8** (4): 757-767
- 57 Morris RM, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson CA, Giovannoni SJ. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities [J]. *Nature*, 2002, **420** (6917): 806-810
- 58 Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Giovannoni SJ. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade [J]. *Nature*, 2002, **418** (6898): 630-633
- 59 Tripp HJ, Kitner JB, Schwalbach MS, Dacey JWH, Wilhelm LJ, Giovannoni SJ. SAR11 marine bacteria require exogenous reduced sulphur for growth [J]. *Nature*, 2008, **452** (7188): 741-744
- 60 Lienen T, Kleyböcker A, Verstraete W, Würdemann H. Foam formation in a downstream digester of a cascade running full-scale biogas plant: Influence of fat, oil and grease addition and abundance of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella* [J]. *Biores Technol*, 2014, **153**: 1-7