



未培养的微生物研究进展*

蓝希钊 周泽扬**

(西南农业大学蚕桑及生物技术学院微生物研究室 重庆 400716)

摘要: 未培养的微生物是指那些到目前为止人们还无法纯培养的微生物。这些微生物可能是以前被描述过的, 更多的则是从未被了解过的。近年来, 对未培养的微生物的研究方兴未艾, 主要是有关环境微生物的遗传多样性分析, 从特定环境中鉴定某些未知的微生物, 从环境微生物中直接克隆基因以及提高环境微生物的培养率等问题。就有关这几个方面的一些研究进展作一个简要的介绍。

关键词: 未培养的微生物, 多样性, 基因克隆, 培养

中图分类号: Q346 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0116-04

自 19 世纪科赫 (Koch) 创立微生物纯培养技术以来, 已有数千种细菌、病毒和约 10 万种真菌在实验室中得到了纯培养。纯培养技术已成了研究微生物的必要技术之一。然而, 越来越多的证据表明, 由于受现有技术的限制, 自然界中绝大部分的微生物是目前人们还无法纯培养的, 甚至是不曾认识的。这些还不能被纯培养的微生物就叫做未培养的微生物 (uncultured microorganisms)。近年来, 国际上掀起了一股研究和开发未培养的微生物的热潮, 从中获得了大量有关的信息, 克隆到了许多新的基因。本文就近年来有关未培养的微生物的研究进展情况作一个简要的综述。

1 环境中微生物的多样性

人们在调查某一样品中微生物总数的时候经常碰到这样一个问题: 通过显微镜观察计数出来的细胞数远远大于用各种培养基培养出来的菌落数。例如, Hayashi 等报道, 直接计数人肠道里的微生物, 大约是 $1.9 \sim 4.0 \times 10^{11}$ cells/g (wet weight), 但能培养出来的为 $6.6 \sim 12 \times 10^{10}$ CFU/g (wet weight), 估计有 60% ~ 70% 的微生物是无法培养的^[1]。对土壤、水体、活性污泥等样品的微生物进行调查统计, 发现直接计数出的微生物数与培养出来的菌落数间相差几个数量级, 见表 1。两种调查结果的差异显示, 一个样品的总微生物数量中, 只有一小部分是人们能纯培养出来的。

表 1 几个环境样品中能培养出来的细菌比率

环境样品	培养率 (%)
海水 (Seawater)	0.01 ~ 0.10
淡水 (Freshwater)	0.25

* 重庆市科委院士基金项目 (No. 2005-8804)

** 通讯作者 Tel: 023-68251088, E-mail: zyzhou@swau.cq.cn

收稿日期: 2005-01-18, 修回日期: 2005-04-10

续表 1

湖水 (Mesotrophic lake)	0.1 ~ 1.0
无污染的河口水样 (Unpolluted estuarine waters)	0.1 ~ 3.0
活性污泥 (Activated sludge)	1 ~ 15
沉淀物 (sediment)	0.25
土壤 (Soil)	0.3

注：能培养的细菌是以集落生成单位 (CFU) 来计算 (引自 Amann RI 等)

不仅在细胞的数量上，而且在微生物种类上也只有一小部分微生物能被纯培养出来。这方面的证据主要来源于对环境微生物的遗传多样性分析，如对 16S rRNA、硫酸盐还原酶、硝酸盐还原酶、固氮酶等基因变异类型的序列差异的研究，其中以 16S rRNA 基因研究的最多。研究的方法一般是先从环境样品中直接提取总 DNA，再用 16S rRNA 的通用保守区作为引物进行 PCR 扩增，测定扩增产物的核苷酸序列。同时测定所有能培养出来的微生物的 16S rRNA 基因序列。通过比对序列，可推断出有多少种类的微生物未能培养出来。Ward 等^[2]用此法研究了美国黄石国家公园 (Yellowstone National Park) 的章鱼温泉 (Octopus Spring) 中的一个微生物区系。他们将未经纯培养直接克隆获得的 16S rDNA 分成 8 组，每组分别代表不同的微生物类群。这些序列没有一个与纯培养出来的微生物的 16S rDNA 序列相同，同源性最高的也只有 94.7%。根据这个结果他们提出“已发现的微生物不到微生物总数 20%”。Hayashi 等用类似的方法分析人肠道微生物的 16S rDNA，也发现 75% 的微生物是新的未知种系^[1]。这些研究表明，自然界中微生物的多样性远远超过了以前人们的想象。现在人们一般认为，环境微生物中 99% 以上是尚未能被培养的^[3]。在原核生物的 40 个分类门中，有一半还没有纯培养出代表种^[4]。

2 特定环境微生物的鉴定

尽管人们还无法分离培养大部分的微生物，但是可以绕过培养障碍，通过运用分子生物学的手段来鉴定某些未知的微生物，这在探究原因不明的传染病时特别有用。Relman 等^[5]运用 16S rDNA 扩增结果来调查 Bacillary angiomatosis 病的病原体。他们用真细菌的 16S rRNA 基因的特异片段作为引物，从病组织样品中直接进行 PCR 扩增，获得了唯一的扩增带；而在正常的组织中扩增不出这样的带。通过序列分析研究，他们认为该病的病原体是一种无法纯培养的杆菌，与已知的杆菌 *Rochalimaea quintana* 最相似。

除了直接从组织中进行 PCR 扩增外，还可以用构建基因文库的方法来鉴定一些与原因不明的传染病相关的微生物。例如，Sakamoto 等构建了两个唾液 16S rDNA 文库：一个来源于齿根骨髓炎病人，另一个来源于健康人。从两个文库中随机挑取部分重组克隆来测定核苷酸序列。结果发现，健康人来源的克隆中没有一个与已知的齿根骨髓炎病原细菌序列相似；而病人来源的克隆中有许多序列与齿根骨髓炎病原细菌序列相似，其中还有些序列是来自于某些未培养的微生物^[6]。

3 从未培养微生物中获取新基因资源的研究

环境中绝大部分的微生物还不被人类所认识，这暗示其中蕴含着大量未知的遗传信息。从未培养的微生物中克隆新的基因，已逐渐成为近年一大研究热点领域，也获

得了相当的成果,得到了许多功能更强、结构更新的基因及基因家族。概括起来主要有两种方法。

第 1 种是鸟枪法。基本思路是先直接提取环境微生物的总基因组 DNA (被称之为“宏基因组 DNA”, metagenomic), 用核酸内切酶进行部分消化, 再与质粒^[7]、粘粒^[8,9]、细菌人工染色体^[10]等载体连接, 转入宿主细胞, 构建基因文库。通过筛选文库来寻找目的基因的阳性克隆。由于这种方法不受已知基因的同源性序列的限制, 因而所获得的基因往往结构很新颖, 甚至是一些新的基因家族成员。这为人类认识未培养的微生物提供了一条有效的途径。Rondon 等以细菌人工染色体作为载体构建了两个土壤未培养微生物基因组文库, 并筛选到了 41 个分别编码脂肪酶、淀粉酶、核酸酶、抗菌、溶血作用等活性的基因, 且 DNA 序列与已知的相关基因序列有很大的差异, 其中一个编码的抗菌肽结构是从未报道过的, 属于新的基因家族^[10]。

第 2 种方法是 PCR 扩增法。这种方法也是先提取待分离样品的宏基因组 DNA, 再用已知基因的保守序列作为引物进行 PCR 扩增, 将得到的 DNA 片段插入载体后转入宿主菌中表达, 检测表达产物; 或测定核苷酸序列, 通过搜索数据库来分析其结构和功能特征。Eschenfeldt 等利用 PCR 扩增法从未培养微生物中克隆到两个新的 2, 5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶, 酶活力比以前报道过的高 20 倍^[11]。

两种方法各有优缺点: 用鸟枪法得到新的基因 (特别是新的基因家族) 的可能性较大, 但是需要构建较大的基因文库, 筛选的工作量大, 且容易漏筛活性较弱的克隆菌以及表达载体不适合的基因; PCR 扩增法比较简单, 工作量较小, 但需要用已知基因的保守序列作为引物, 因而发现新的基因家族的可能性也较小。

为了克服两种方法的不足, 有的学者把两者结合起来。他们对 PCR 法进行改良, 采用的引物不是某一个特定基因的序列, 而是一些伴随基因的可移动元件的保守序列, 如质粒、转座子、整合子等。由于没有受已知基因内部序列的限制, 所以扩增出来的产物也就可能与已知基因相差很大。整合子是一种可捕获和表达基因的系统, 广泛存在于细菌染色体中。整合子两端含有高度保守的序列, 基因则位于中间。Stokes 等利用这一特点, 根据整合子的保守区设计了两个引物, 对 113 份土壤 DNA 样品进行 PCR 扩增。他们用扩增产物构建了一个克隆文库, 测定了其中 114 个克隆的外源基因序列, 得到 99 个不同的序列, 可能含有 123 个基因序列组件。他们分析了其中的 107 个开放阅读框 (ORF), 在数据库中找不到一个相同的序列, 只有 13 个序列与已知基因有较高的同源性^[12]。这种方法结合了传统鸟枪法和 PCR 法的优点, 既减少了筛选的工作量, 又能得到较多的新基因及新基因家族。但是, 由于没有明确的功能基因指向, 利用这种方法得到的多半是些功能未知的基因。

4 将未培养的微生物转变成可培养的微生物

尽管人们采用绕过培养障碍的方法对未培养的微生物进行了广泛的研究, 也取得了不少的成就, 但毕竟只能获得一部分信息。人们仍然希望能将尽可能多的微生物转变成可被纯培养的微生物, 因为那将增加新的代谢产物的来源。

可以从多方面来培养那些尚未培养的微生物。第 1 种方法是根据微生物的某些特性, 特异地添加微生物生长所必需的营养成分, 从而使原先无法培养的变成可培养的。例如, Kashefi 等^[13]根据嗜高热微生物利用 Fe (III) 作为终端电子受体这一高度保守

的特性,在培养基中添加非常微量的 Fe (III) 氧化物。这种方法的前提是对微生物的特性有一定的了解。

第 2 种方法是用低浓度的培养基来进行分离培养。一般认为,传统的培养基营养太丰富,不适合于那些原先生长在缺乏营养的环境中的微生物,如海洋微生物。Connon 等^[4]用比实验室中常用的培养基营养低 3 个数量级,小体积、低营养的培养基来分离海洋中的微生物。从 11 个样品中分离出 2,500 个培养物,其中有 4 个单细胞系是以前从未培养过、也从未描述过的。通过这种方法,使海洋样品中浮游细菌的可培养率提高到 14%,比以前提高了 14~1,400 倍。这种方法对于分离某些特定生态环境的微生物有一定的作用。

要将尽可能多的微生物转变成可培养的,就要让培养条件尽量模拟成原先的自然状态。如:用土壤浸提物和海水滤过液来制作培养基,这类方法已渐趋成熟。但传统的平板培养法使营养成分和微生物的代谢产物基本上都固定不动,这与实际的自然环境有很大的差别。Zengler K 等^[14]设计了一个非常精妙的方法,将细胞包埋在凝胶微滴板中,在低营养的流动培养液中进行培养,再用流动血细胞计数法检测微滴板上有多少个微克隆。这是一个开放流动的系统,微生物间的代谢产物及信号分子可在凝胶空隙中进行扩散而被其他菌利用。这与自然环境有很多的相似之处,因而新培养出来的微生物种类也大大增加了。这种方法可用于包括土壤和海水的各种环境。

当然,自然环境的条件是异常复杂、动态变化着的,人们不可能将其完全模拟出来,因而,可以说,在可预见的未来人类是不可能将所有的微生物都转变成可培养的。

近年来,国内也有学者开展对未培养的微生物的研究,如杜涛等对从土壤中提取高质量 DNA 的方法进行了探索^[2];北京大学生命科学学院的王啸波等构建了环境 DNA 基因文库,测定了其中部分重组克隆的核苷酸序列,推断有一些未见报道的新基因^[15]。但总的说来,我国在这方面的研究还是非常有限的,跟国外相比还有很大的差距。

在过去的一百多年里,人们从微生物的代谢产物中分离纯化了大量的活性物质,仅抗生素就有几千种。但是,随着社会的发展,人们已经越来越难从已知微生物代谢产物中分离到新物质了,越来越难适应社会发展的需要了。由于自然界中大部分的微生物仍未被人们认识和开发,它们产生的代谢产物也未被人们利用,这又为我们开发新资源提供了广阔的来源。

参考文献

- [1] Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. *Microbiol Immunol*, 2002, **46** (8): 535~548.
- [2] Ward D M, Weller R, Bateson M M. *Nature*, 1990, **345** (6270): 63~65.
- [3] 杜涛,周宁一. *微生物学通报*, 2004, **30** (6): 1~5.
- [4] Connon S A, Giovannoni S J. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (8): 3878~3885.
- [5] Relman D A, Loutit J S, Schmidt T M, *et al.* *N Engl J Med*, 1990, **323** (23): 1573~1580.
- [6] Sakamoto M, Huang Y, Umeda M, *et al.* 2002, **217** (1): 65~69.
- [7] Anke H, Ruth A, Schmitz, *et al.* *Appl Envir Microbiol*, 2000, **66**: 3113~3116.
- [8] Brady S F, Chao C J, Handelsman J, *et al.* *Org Lett*, 2001, **3** (13): 1981~1984.
- [9] Cottrell M T, Moore J A, Kirchman D L. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (6): 2553~2557.
- [10] Rondon M R, August P R, Bettermann A D, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (6): 2541~2547.
- [11] Eschenfeldt W H, Stols L, Rosenbaum H, *et al.* *Appl Environ Microbial*, 2001, **67**: 4206~4212.
- [12] Stokes H W, Andrew J, Holmes, *et al.* *Appl Envir Microbiol*, 2001, **67**: 5240~5246.
- [13] Kashefi K, Holmes D E, Reysenbach A L, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (4): 1735~1742.
- [14] Zengler K, Toledo G, Rappe M, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (24): 15681~15686.
- [15] 王啸波,唐玉秋,王金华,等. *微生物学报*, 2001, **41** (2): 133~139.