

海洋环境中难培养微生物的寡营养培养

田 甜^{1,2,3} 李冬梅^{2,3} 戴世鲲^{1,3} 殷克东^{2*} 孙慧敏^{1,3} 李 翔^{1*}

(1. 中科院南海海洋研究所中科院海洋生物可持续利用重点实验室 广东省海洋药物重点实验室 广东 广州 510301)

(2. 中国科学院南海海洋研究所 热带海洋环境动力学实验室 广东 广州 510301)

(3. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要: 海洋中存在着丰富的微生物资源,但迄今为止能够在实验室培养的微生物却不到 1%,而且能够通过培养得到的环境优势种更少,这成为当代环境微生物学研究和海洋资源开发的最大障碍。过去十多年来,通过不断改进培养方法和检测手段,发明了许多新颖独特的技术,提高了培养效率。特别是通过海洋微生物的寡营养培养技术,分离并命名了一些难培养微生物,给予人们极大的启发。海洋微生物资源的可持续性开发和利用,是 21 世纪人类发展的重要方向,是我们研究海洋微观世界的基础,值得微生物学界同仁的共同关注。

关键词: 难培养细菌,寡营养培养,海洋微生物,系统分类学

Culture Methods of the Oligotrophic Marine Microbes

TIAN Tian^{1,2,3} LI Dong-Mei^{2,3} DAI Shi-Kun^{1,3} YIN Ke-Dong^{2*}
SUN Hui-Min^{1,3} LI Xiang^{1*}

(1. Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Materia Medica, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(2. Key Laboratory of Tropical Marine Environmental Dynamics, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(3. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Molecular methods and fluoroscopic techniques suggest that rich microbial diversity exist in the marine environment, but less than 1% of these microbes can be cultured in the laboratory conditions, and that the cultivable dominant species were even less. This limitation has long been a barrier to the development of environmental microbiology and the utilization of marine resources. In the past decade, novel methods for culture and detection of these uncultured marine microbes have successfully applied to obtain several conventionally-uncultured microbes including those from extreme environments. Those progresses have inspired researchers greatly. Developments in the research of marine microbial resources are an important basis for the study of the micro-world and deserve increasing scientific attention.

Keywords: Uncultured microorganisms, Oligo-culture, Marine microbes, Phylogenetics

早在 1959 年,人们就认识到在琼脂平板上可培养的微生物和通过显微计数测得的微生物相差好几

个数量级。1987 年 Carl Woese 通过生物核糖体 RNA 的序列分析提出了生物体三域的学说,自此,16S

基金项目: 国家基金委基金项目(No. 40676074); 大洋协会项目(No. DYXM115-02)

* 通讯作者: 李翔: ✉: lixiang@scsio.ac.cn; 殷克东: Tel: 86-20-89023206, ✉: k.yin@scsio.ac.cn

收稿日期: 2008-11-12; 接受日期: 2009-02-10

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

rRNA的系统分类学研究日见广泛地应用于环境微生物分析。这种基于DNA/RNA测序技术与序列分析的方法不依赖于传统的微生物培养技术，极大的拓宽了人们对地球上微生物多样性的认识。至今为止，

在人类已知的原核生物 53 个门的分类单元中(图 1)，只有 26 个门囊括了经过实验室培养的细菌^[1,2]。在可培养微生物的 16S rRNA 基因库中，紫色光合菌 (Proteobacteria) 等细菌(包括Cytophagales和两

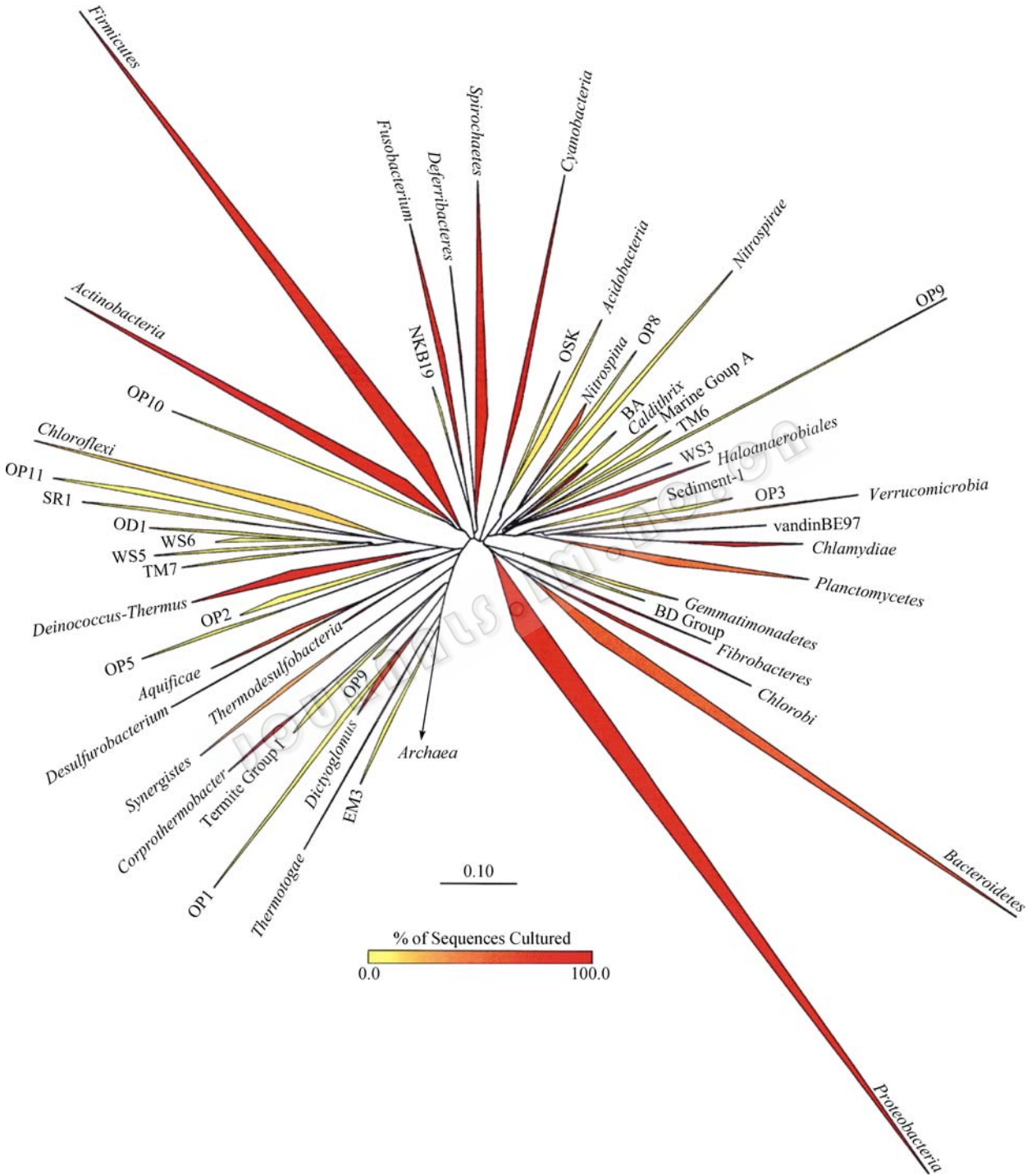


图 1 根据ARB2003 年公开的数据库(<http://arb-home.de>)中 16964 条 16S rRNA 序列构建的细菌系统进化树^[2]
Fig. 1 Phylogenetic tree of bacteria established with the November 2003 ARB database (<http://arb-home.de>) with 16964 16S rRNA sequences^[2]

注：图形的顶角表示该门中 RNA 序列的相对丰度，红色程度代表可培养微生物的比例，黄色部分表示该种群中全部为未培养微生物。
Note: The vertex angle of each wedge indicates the relative abundance of sequences in each phylum; the redness of each wedge corresponds to the proportion of sequence in that phylum obtained from cultured representatives. Candidate phyla do not contain any cultured members.

类革兰氏阳性菌: *Actinobacteria* 和低G+C 含量菌) 占有已知细菌的 90%^[3]。此外至少有一半的微生物只是以RNA序列的代号存在于环境基因序列库中^[2], 对它们的分类命名还需要培养方法上的进一步改进而加以确认。

当前, 微生物培养仍然是海洋微生物学和微生物生态学研究中的重要一环。海洋环境中优势异养浮游菌获得培养后, 研究者可对影响其个体生长的营养条件和其他环境变量进行研究, 从而确定该优势种在地球化学循环中所起的生态学作用。此外, 人们普遍认为生长缓慢的海洋细菌是潜在的药源生物, 产生许多具有独特药用价值的新颖天然产物^[4,5], 这些微生物的进一步培养是未来新药发现的重要前提。

海洋环境中, 细菌是跨界面物质输送的主要化能异养生物, 它们在Nanomolar水平调节水体可溶性生物来源的有机质, 有助于补充和丰富食物网, 但在这方面相关单种的生理生态作用研究还很少, 许多环境中的优势种都不可培养^[6], 大量的、多样化的浮游寡营养细菌很少被人们所关注, 因为如何有效而方便的进行实验室培养仍然是一道鸿沟, 其特殊的营养需求-寡营养条件, 仍然值得我们投入相当多的研究力量。

1 寡营养培养的概念

通常情况下, 海洋是典型的寡营养环境, 溶解性有机碳(DOC)水平常年维持在 50 $\mu\text{mol/L}$ ~100 $\mu\text{mol/L}$ 或 0.6 mg/L~1.2 mg/L。偶然情况下, 局部营养可能出现极大的波动。过去认为这种碳源极低的环境普遍不适合微生物的生长, 偶然出现的局部营养富集, 才是海洋微生物多样性的原始策动力。然而, 近几年的研究表明, 海洋微环境的多样化使细菌具有了明显不同的生长特征^[7], 从而形成了极富特征的海洋微生物多样性, 按不同的生存策略, 这些微生物可分为富营养菌和寡营养菌(Oligobacteria)。

富营养菌代表了生态学里的机会种, 为了充分利用海洋中偶然和局部出现的富营养环境, 这些微生物可以快速移动, 高速生长^[8], 其生长和死亡率变化较大, 细菌丰度波动较大^[9]。

与富营养菌相反, 在寡营养海水中生活的细菌需要一个更节约能量的生存策略, 它们自由生活在极低水平碳环境中, 个体微小, 生长缓慢, 生长速

率和丰度变化很小^[10], 以达到最大的营养利用率。这些微小的寡营养细菌有一个高效的营养吸收机制, 在低营养浓度下, 它们依然可以吸收足够的有机质来维持生长, 营养的增加甚至会阻碍其生长^[11]。

Kuznetsov等将寡营养微生物定义为可在有机碳含量 1 mg/L~15 mg/L的培养基上生长的微生物^[12], Ishida 等认为生长在低于 1 mg/L的有机碳水平的细菌才属于寡营养类型^[13], Fry则将其描述为不能在大于 6 mg/L的有机碳浓度中生长的微生物^[14]。但寡营养状态是一种适应于超低营养条件下的生活史而非一个固定的生理特征, 因为有些寡营养菌在分离出来以后可以逐渐适应富营养的培养条件^[15], 其生长速率和细胞形态往往也随之发生相应的变化。

寡营养菌在系统发育上可能分属不同的进化分支^[16]。*Pelagibacter ubique*, 其基因组和ORF(Open reading frames)是已知自由生活微生物中最少的, 但相对含有 20 个氨基酸完整的生物合成路径^[17]; 一株寡营养菌*Rhodococcus erythropolis* N9T-4, 在寡营养条件下会大量合成 2 种蛋白分子, 酶活性是添加正十四烷异养培养条件下的 3 倍^[18]; 而一株生存于寡营养、寒冷和高压下深海细菌*Shewanella piezotolerans* WP3, 其基因组包含了大量的基因和基因簇, 有助于其在极端生存条件下蛋白质作用、大分子的合成以及营养和能量的获取, 是其适应变化的能量来源和多种环境条件的基础^[19]。

海洋环境中这些寡营养菌的特性使其在物质循环中占有重要地位^[20], 许多是环境中的优势种。但由于这些细菌中绝大多数很难通过传统的平板方法进行培养, 人们对其知之甚少。有关海洋微生物的营养、遗传和生化性质的研究通常都集中在形体较大、易培养的种类中, 但它们大多数都不是环境中的优势种。以此为基础的生物学与生态学研究, 所得的结论和预测往往与自然情形相差悬殊。

从海洋环境样品中构建的 16S rRNA基因文库中我们了解到 α -*Proteobacteria* 是海洋环境中重要的群体, 其中大多数序列系统分类学上都属于SAR11, 大洋菌属(*Pelagibacter*)的细菌, 它们形体微小, 生长缓慢, 在固体培养基上绝大多数不能形成菌落^[21]。此外, 许多丰度最高的海洋微生物种群, 包括SAR86、SAR116、SAR202、SAR324、SAR406、*Actinobacteria*、*Crenarchaeota*等, 至今仍未能培养成功。

但有一些菌株, 比如: *Proteobacteria*、*Planctomycetes*、*Bacteroidetes*、*Acidobacteria*和*Verrucomicrobia*中的很多细菌已经培养出来, 培养成功的原因可能是培养条件与自然环境在营养成分上相近(寡营养培养)。2002年SAR11纯培养的获得是寡营养培养方法一个较大的成功。占海水表层原核生物组成1/3的SAR11之前只存在于16S rRNA库中, *Pelagibacter ubique*^[21]做为SAR11中第一株被分离的菌株, 现已有较为充分的研究, 而*S. alaskensis* RB2256^{T[22]}分离出来后, 被作为寡营养微生物的模式种进行研究, 这个菌可以在含量低于1 mg/L 碳的寡营养条件中生长, 却不能在超过5 mg/L碳的培养基上生长; 另一方面具有超微型的体积($<0.1 \mu\text{m}^3$)和极低的生长速率($\mu 0.2 \text{h}^{-1}$); 此外, 其营养吸收系统具有较高的亲和力^[23]。这些成功培养的微生物可以助我们了解细胞的生理并验证根据基因组测序推出的结果, 同时, 做为生物地化循环的重要部分, 对这些成功培养的微生物的基因组序列分析的结果, 也有助于我们更好的理解寡营养菌对环境的适应机制。

近来, 荧光显微技术及分子生物学技术研究表明: 在大洋和近海环境中, 虽然海洋细菌在浮游生物量上常常占有优势, 但分别只有0.01%到0.1%的海洋微生物能通过传统的固体平板技术形成菌落, 许多能在显微镜下观察到的环境微生物都不能在平板上形成可见的菌落^[24]。通过控制培养基的成分提高从自然环境中分离新细菌类型的手段只取得了有限的进展, 大量不可培养的微生物仍是微生物学的一个挑战。

2 影响寡营养微生物实验室培养的限制因子

海洋微生物的纯种培养是一项困难和耗时的工作, 没有一种培养基或单一的培养条件可以检测到所有可培养的细菌。传统培养方法费时费力, 而且会选择性的使部分微生物生长。早期的海洋微生物学家认为通过改进的琼脂平板培养基可以从丰富的大洋细菌中分离到较多的可培养菌^[25], 通过分离实验、自由细胞的形态学和革兰氏染色实验, 这种观点得到了支持。人们发明了许多固体和液体的培养基配方, 培养、分离和命名了很多形态上和生理上差异巨大的海洋微生物。但长期以来人们秉承的富

营养培养的传统, 在培养基或培养液中加入某些极高浓度的营养物或一些特别的营养成分, 形成了人工培养条件的另一种缺陷-富营养。最近的一些研究结果表明, 如果提供和自然状态相似的物质成分, 可以得到一些原本无法培养的微生物^[21], 在此基础上改进的培养基分离到了之前未能培养的微生物, 这说明我们对海洋微生物的生长需求还不够了解可能是造成其培养率偏低的一个原因^[26]。

现有的研究表明海洋微生物难于人工培养的原因可能有以下几个:

1) 氧化环境的压力, 如SOS反应对细胞造成的损伤及修复阻碍了它的生长^[27], 在一些实验中, 丙酮酸盐或过氧化氢酶的添加减轻了氧的毒害, 增加了可培养菌的数量^[28]。

2) 高浓度营养物质的抑制作用 (Substrate- accelerated death): 一般实验室培养基中营养物的浓度可能比原环境高出3个数量级, 自然条件下占优势的微生物种群有可能不适应含有高浓度复杂有机碳的培养基, 如*Escherichia coli*、*V. vulnificus* 或*Micrococcus luteus* 细胞在最佳酶活温度, 突然转移到富营养培养基, 会瞬间产生超氧化物和其它基团^[29]。

3) 许多环境微生物与其它生物共生共存, 利用细胞间的联系和相互促进可以分离难于正常培养的微生物, 而目前实验室条件下普遍缺乏相应的培养系统。

4) 微生物的生长要求较苛刻, 实验中建立的培养条件可能不适合其生长需要, 某些微量毒性物质的污染, 可能使部分微生物无法生长。使用非琼脂培养基的一些尝试获得了成功, 在Alaska和Netherlands海域, Button等利用过滤灭菌的海水进行稀释培养, 海洋浮游菌的培养率达到了2%到60%^[23]。

5) 样品从采集到培养的间隔时间对培养率也有影响, Ferguson及其同事发现20摄氏度, 存放在4 L的瓶子里的样品, 30 h后在Zobell (MA2216E)上的培养率增加了0.1%到41%^[30]。

6) 另外, 病毒感染也可能是培养效率低的部分原因, 7%的菌群携带病毒, 表层海水细菌的死亡, 约10%到50%是病毒感染造成的, 并且选择性感染会改变环境细菌群落的组成^[31,32]。烈性病毒的感染是致死性的, 而被溶原病毒感染的带毒菌株移至加富培养基中时, 也会诱发病毒复制和菌体裂解。

此外,在压力环境下的适应性机制:程序性细胞死亡^[33];有生存能力但不可培养细胞—休眠细胞的形成以及一些缓慢生长的微生物;细胞密度的检测限等可能都是实验中培养率较低的一些原因。

3 寡营养培养的新型方法

3.1 菌落转移法(Removing newly formed colonies)

当环境样品转移到固体培养基上时,一些寡营养菌的生长可能会有一个延迟期,在此期间,这些菌可能会被其他快速生长的菌落所掩盖,如一些可以在平板表面滑动和快速分散的细菌。

菌落转移法是将平板上新形成的菌落不断地转移到新的培养基上,通过长时间的培养使那些生长较缓慢的寡营养菌得到生长和分离的机会。Eilers等^[34]通过这种方法从德国German Bight表层海水中分离出许多新的浮游菌,观察到的菌落数是普通平板培养的5倍,并且细菌的种系组成也会随培养时间的延长而变化。

3.2 极端稀释法(Dilute to extinction culture)及高通量培养(High-throughput culturing)

极端稀释培养是将环境微生物样品不断稀释,使最后一个稀释度中的细胞含量极低(1~10个细胞),其培养液中的营养物浓度一般也很低,最大程度的模拟自然条件下的寡营养状态,会使用未加改动的环境水体作为稀释液和培养液。这种培养方法倾向于选择丰度最大而不是营养感应与耐受性最强的微生物,也就是说,不是最容易培养的,而是自然环境中数量上占有优势的种群。在这种菌群和营养都极端稀释的条件下,数量较多、生长缓慢的海洋寡营养菌的培养占优势。

极端稀释法常常能够得到纯培养^[23],已经开始应用于一些海洋微生物研究中。Karin Simu等使用极端稀释法,运用6种不同的手段来计算细菌数量,调查了存在着不同生存策略的浮游菌的培养率和共存关系^[35]。Schut等用过滤蒸汽灭菌的海水做培养基分离到了*Sphingomonas alaskensis*(菌株RB2256)^[22]。Button等成功地从Alaska和Netherlands附近海水中分离到两种新的寡营养异养菌*Sphingomonas alaskensis*和*Cycloclasticus oligotrophus*^[23],同时浮游菌的培养率从2%增加到60%。

Connon和Giovannoni利用高通量的极端稀释培

养法,可培养微生物的数量达到了传统培养方法的14倍到1400倍,分离得到了许多人类以前从未培养和描述过的独特种系^[1],其中一些海洋浮游细菌的16S rRNA序列长期存在于海洋微生物的克隆文库中,但之前从未成功得到实验室培养。此后,这种高通量的极端稀释培养法成为一个吸引人的纯种培养的方法,我们正在努力尝试,希望将这种高通量方法进一步改良,广泛用于培养环境中的优势微生物种群。

3.3 模拟环境的扩散培养室(Diffusion chambers)及单细胞封装培养(Single cell encapsulation procedure)

扩散培养室两端用0.03 μm微孔滤膜封闭,样品稀释后与自然海水琼脂培养基混合倒入培养室,然后整体置于类似于自然水体的环境中进行培养。这种培养室限制了微生物细胞的进出,但允许化学物质的交换,提供了环境相同组成的化学成分,微生物可以得到由环境提供的各种营养物质。

Kaeberlein等使用这种方法对环境中的微生物进行了培养,多达40%的接种细胞获得了单克隆,平均成活率达到22%,可以连续培养的微生物数量是传统培养方法的700倍。他们还发现一些分离的菌株不能单独在人工加富培养基上生长,但与其他微生物共同培养时可以获得菌落,表现为协同生长^[36],这解释了部分微生物不可培养的原因,即微生物种内与种间需要信息素进行交流,这些信息素有可能是来自相邻种群的特殊的信号,这种信号可能是存在适合生长的环境的暗示,因为即使存在合适的营养(加富培养基),一些分离得到的微生物也不能生长,使用扩散培养室克服了这种限制。

与扩散培养室法类似,单细胞封装培养同样允许细胞在环境营养浓度条件下生长。这种方法又称凝胶微滴培养,是结合单细胞包埋和流式细胞技术的高通量培养法^[37]。待培养的微生物细胞稀释后与融化的琼脂混合,在专门的搅拌器中用油乳化,最后形成直径约30 μm~50 μm的胶滴,10%的胶滴会含有单个的细胞。胶滴做好后装于层析柱,两端以不同孔径的滤膜封口,培养基低速流过,未结合于凝胶的自由细胞则被洗脱,最后用显微镜或流式细胞仪来检测含微菌落的凝胶微滴。实验显示包埋不会影响细胞的生长,这保证了细胞的存活能力,并且可以防止其他细胞污染。而包埋细胞的再培养更为

简便:微滴中细菌的长期生长会造成胶滴破裂后长出菌落进入周围的培养基,一般不需要加入 琼脂酶来消化得到细胞,含有菌落的胶滴可以直接置于琼脂培养基使菌落继续生长(图 2)。

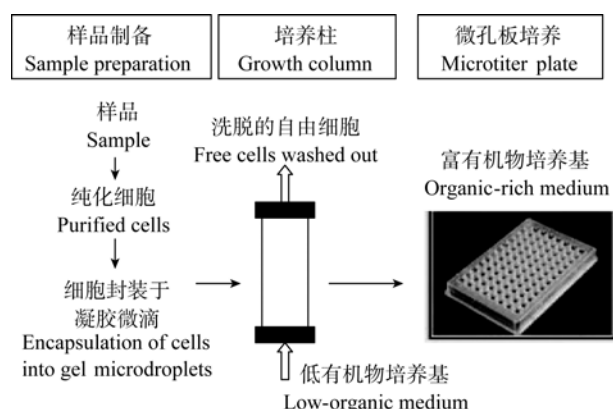


图 2 凝胶微滴培养示意图(修改自“Cultivating the uncultured”^[38])

Fig. 2 Model of gel microdroplets culture method (drawn after “Cultivating the uncultured”^[38])

凝胶微滴以前多用于分离缓慢生长的酵母细胞,鉴别分泌抗体的细胞,研究单个细胞的生长等,也用来分离和研究有生存能力但不可培养的微生物^[38,39], Manome等基于Leuconostoc在胶滴里形成微克隆的能力,分离了 Leuconostoc-Bacillus混合物^[40]。Akselband等通过这种方法分离的 12 株海洋微生物中,9 个(75%)生长快过液体培养^[41]。Zengler等用这种培养方法,发现分离得到的细菌范围广泛,16S rRNA序列分析表明用海水培养得到的微菌落比最初的环境样品有更广的代表性,只有 47%属于常见的 9 个浮游细菌种群,许多序列在以前典型的可培养微生物中没有发现,也不存在于环境基因组文库^[38]。

凝胶微滴培养与标准的稀释法相比有以下几个特点:1) 虽然每个细胞单独封装,但在一个容器里共同培养。这在一定程度上更接近自然环境,因为凝胶微滴的孔径较大,允许代谢物及其他分子(如信号分子)的交换;2) 细胞处于一个开放的、连续流加的培养体系,营养上更接近自然界的竞争环境;3) 高通量培养大大的提高了培养效率,可以为微生物下游工程提供更广泛的资源;4) 使缓慢和快速生长的微生物在低物质浓度培养下同时生长,减弱了培养物中快速生长微生物的生长优势;5) 借助荧光显

微镜对细菌生长的灵敏检测能力,这种方法可以用于分析在原生态条件下不同生物间的相互作用;6) 寡营养培养中的营养条件足以支持微生物长时间的生长;可以用于环境微生物学、全细胞工程及药物研究。

3.4 过滤——环境适应法(Filtration-acclimatization method, FAM)

这个方法是在培养之前增加了一个预过滤步骤。预过滤可以移除大的丝状菌和大多数菌体纠结的细胞,这将影响和改变浮游菌的组成^[42], 1.2 μm 孔径纤维素酯滤膜可以得到海水中约 50% 的细菌, 0.22 μm 滤膜可移除大部分(大于 90%)已有培养的细菌(机会种)^[43]。

第 2 步是一个环境适应的步骤,通过由低到高逐步增加营养物浓度的方法,使环境微生物从寡营养环境缓慢的过渡到标准的微生物培养基中,避免了突变的高浓度有机质培养造成的死亡,但这对分离缓慢生长并有较长延滞期的细菌效果不明显。

Gasol等采用这种方法从淡水表层分离到可在高底物浓度的琼脂培养基上形成可见菌落的 65 株纯种菌株,88%可以归为没有描述过的种类(序列相似性小于 97%)。形成对比的是, FAM得到的菌株中有 56%为不可培养细菌,而同样样品用标准的培养方法没有得到一株不可培养细菌^[43]。

这种方法增加了可培养菌的多样化程度,能够分离培养还未能培养的细菌。今后可以用较大孔径的过滤方法来分离新的种类,环境适应的步骤也可以与分选方法结合,例如与稀释法结合。

3.5 不同培养条件的运用

由于自然界中细菌种群的高度多样性,多数细菌不能通过同一种培养方法得到。同时使用不同的生长培养基可以提高培养效率,然而不同培养条件如氧分压或温度等对培养的影响,至今还没有系统的研究,较多的是一些非常规的营养元素、信号分子和选择性抑制剂的研究。

Bussmann等^[44]有选择的改变培养基成分,发现最重要的影响因子是有机质的浓度。有机质的浓度大小能够显著的影响最大可培养菌数(Most probable number, MPN),最优条件下能够显著增加培养效率。

酰基同型丝氨酸内酯(acyl-HSLs),尤其是低浓度 *N*-(oxohexanoyl)-DL-HSL(OHHL)和 *N*-(butyryl)-

DL-HSL(BHL), 能够被一些革兰氏阳性菌接受到, 帮助这些细菌感受环境因子中特别是营养因子的改变, 从而选择性进入生长、繁殖或休眠状态。环状AMP (cAMP)是有研究的最有效的信号化合物, 海水中胞外的cAMP 的浓度在 1 pmol/L~35 pmol/L之间, 这种物质在革兰氏阴性菌很多基因调节中起作用, 低营养浓度的液体培养基中加入该信号分子后培养效率显著提高, 以前许多无法培养的微生物转而成为可以培养的细菌, 使得可培养细菌的数量得到了大规模的提高^[26,45]。另一个对海洋微生物的培养影响较大的化合物是ATP, 它在海水中的含量约为 0.2 nmol/L~1.2 nmol/L, 能够被海洋细菌快速利用, 它的来源可能是浮游植物。

4 寡营养培养检测手段的发展

无论尝试何种培养方法, 最后都要评估其结果。这是一个潜在的艰苦工作。人们在尝试多种培养基及培养条件时, 对所培养的微生物可能一无所知, 一些高通量的方法和高灵敏度的观察和检测技术是非常重要的。

很明显, 成活率的判定取决于操作, 这代表了细胞生长到可被观察者辨别的能力。海洋细菌成活率被低估的一个原因是传统检测方法的限制, 大多数海洋细菌在还未达到可见浊度时已经进入稳定期, 因此, 成活率限定为生长到可以被检测到的浓度的能力, 真实的成活率可能更高。现在一些学说提供了较精确的成活率分析方法, 这为我们增进实验研究提供了理论框架。

荧光显微技术和流式细胞技术使检测的灵敏度提高了 3 个数量级, 通过流式细胞仪, 混合物中的单个细胞可以以 $10^4/\text{min}$ 的速度得到分析并可在低至 $10^4/\text{mL}$ 浓度下进行分组, 这个浓度约为多数水体微生物浓度的 1%, 这种灵敏度足以检测海水中的细菌, 相应的细胞干重、DNA含量和相关染色质比率等参数也可以进行测量。但即使这样, 微生物浓度有时也只处于检测限附近, 并且微生物生长速率在这一段明显降低, 一些可培养的细胞有可能检测不到^[23]。因为在每毫升 10^4 个细胞时, 海水可能不足以支持所有菌株的继续生长, 有时营养的加入可以增加这个数量, 但又会阻碍某些细菌的生长。

总的细菌计数(Total bacterial counts, TBC), 可采用不同的染色方法, 如AO染色(Acridine orange),

DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) 或 SYBR Green染色。这些方法都高估了真正可培养的细胞, 因为有大量与细菌类似的无生命颗粒物以及死亡和损伤的细胞存在其中。Zweifel 和 Hagström 认为不活跃的Ghost细胞存在的部分原因是因为非专一性染色, 而异丙醇可以将损伤的细胞洗掉, 只留下那些完好的^[46]。

为了克服这个差异, 新的更加专一性的核酸染色方法开始应用于研究^[47], 一种双链核酸染色法(A nucleic acid double staining protocol, NADS)被用来分辨海洋环境中可存活、损伤和死亡的细胞; 基于电子传递系统活力的测定法也广泛得应用在活性细胞的检测中^[48]; 细胞间膜内外电压的不同也能作为活性新陈代谢的标志区分死活细菌; 通过平板计数或液体培养的MPN技术可得到需氧异养菌的可培养数, 但获得的细胞计数结果常常偏大。另一方面, 分子探针 16S rRNA原位杂交的应用也能得到总细胞数的 50%^[49,50]。

5 结语

任何给定培养基的内在选择性和培养条件都会影响及限制环境样品微生物的性质、数量及多样性, 因此, 模拟自然环境的分离手段的应用可能会增加难培养微生物分离纯化的几率。目前相关研究所取得的成功可以归结为以下几点: 1) 与自然环境相似的寡营养环境有助于分离到真正的环境优势种群^[36,51], 有时人们直接在海水样品所处的自然条件中培养; 2) 非常规的营养源、信号分子或抑制剂的使用可以抑制不适应的生物体生长^[26,45]; 3) 寡营养条件下长时间的培养, 能够得到较高的计数结果, 细菌的数量会随时间而增加; 4) 特殊的培养条件如适当改变氧气及二氧化碳浓度、增加或是减低大气压力、活性氧浓度等均有助于特定种群微生物的培养和分离。

在此基础上, 我们认为适当考虑下面几个方面能够进一步改善寡营养难培养海洋微生物的实验室分离和培养, 从而不断充实海洋微生物大家庭的新成员: 1) 用孔径小于 1.2 μm 的滤膜, 进行持续过滤除去较大颗粒的高活性细菌; 2) 通过极限稀释得到环境优势菌; 3) 使用半固体培养基结合液体培养来分离不能在气液界面生长的微生物。

总而言之, 海洋环境千差万别, 造就了辽阔海

洋丰富的生物多样性。依靠科学家们不断的努力,人们正在不断的探索和发现新的途径与方法,分离、培养、鉴定和保存千百年来自然存在的海洋微生物资源,希望我们能够赶在因环境恶化而造成的资源流失之前,分离保存更多的海洋微生物,更有效地维系环境,特别是海洋环境的生物多样性。为此,寡营养培养的方法应该得到更为广泛的关注和应用。假以时日,海洋微生物多样性的探索与保护必将为人类带来新的药物、工业用酶和取之不尽的资源。

致谢:本文是国家基金委基金项目(No. 40676074)和大洋协会项目(No. DYXM115-02)研究的一部分。本文的通讯作者李翔是中国科学院“引进国外杰出人才计划(百人计划)”入选者,感谢中科院和中科院南海海洋所的大力支持。

参 考 文 献

- [1] Connon SA, Giovannoni SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(8): 3878–3885.
- [2] Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, **68**(4): 669–685.
- [3] Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**(18): 4765–4774.
- [4] Donia M, Hamann MT. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet Infectious Diseases*, 2003, **3**(6): 338–348.
- [5] 刘晶晶, 陈全震, 曾江宁, 等. 海洋微生物活性物质的研究进展. *海洋学研究*, 2007, **25**(1): 55–65.
- [6] Rapp'e MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 2003, **57**: 369–394.
- [7] Azam F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science*, 1998, **280**(5364): 694–696.
- [8] Grossart HP, Kiorboe T, Tang K, *et al.* Bacterial colonization of particles: growth and interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(6): 3500–3509.
- [9] Weinbauer MG, Hofle MG. Distribution and life strategies of two bacterial populations in a eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(10): 3776–3783.
- [10] Schut F, prins RA, Gottschal JC. Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquatic Microbial Ecology*, 1997, **12**: 177–202.
- [11] Roszak DB, Colwell RR. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1987, **51**(3): 365–379.
- [12] Kuznetsov SI, Dubinina GA, Lapteva NA. Biology of oligotrophic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 1979, **33**(1): 377–387.
- [13] Ishida Y, Imai I, Miyagaki T, *et al.* Growth and uptake kinetics of a facultatively oligotrophic bacterium at low nutrient concentrations. *Microbial Ecology*, 1982, **8**(1): 23–32.
- [14] Fry JC. Oligotrophs. In: Edwards C, (Ed). *Microbiology of extreme environments*. New York: McGraw-Hill, 1990, pp.93–116.
- [15] Schut F, De Vries EJ, Gottschal JC, *et al.* Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(7): 2150–2160.
- [16] 张崇邦, 黄立南, 栾天罡, 等. 寡营养细菌及其在环境科学中的应用. *应用生态学报*, 2005, **16**(4): 773–777.
- [17] Giovannoni S, Tripp H, Givan S, *et al.* Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science*, 2005, **309**(5738): 1242–1245.
- [18] Ohhata N, Yoshida N, Egami H, *et al.* An extremely oligotrophic bacterium, *rhodococcus erythropolis* N9T-4, isolated from crude oil. *Journal of Bacteriology*, 2007, **189**(19): 6824–6831.
- [19] Wang F, Wang J, Jian H, *et al.* Environmental adaptation: genomic analysis of the piezotolerant and psychrotolerant deep-sea iron reducing bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3. *Public Library of Science*, 2008, **3**(4): 1–12.
- [20] Simu K, Hagstrom A. Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(4): 2445–2451.
- [21] Rappe' MS, Connon SA, Vergin KL, *et al.* Cultivation of ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, 2002, **418**: 630–633.
- [22] Vancanneyt M, Schut F, Snauwaert C, *et al.* *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, **51**(1): 73–79.
- [23] Button DK, Schut F, Quang P, *et al.* Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(3): 881–891.
- [24] Eilers H, Pernthaler J, Glockner FO, *et al.* Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(7): 3044–3051.
- [25] Colwell R, Grimes D. Nonculturable microorganisms in the environment. *Am Soc Microbiol*. 2000, p.360.
- [26] Bruns A, Cypionka H, Overmann J. Cyclic AMP and Acyl

- homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the Central Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(8): 3978–3987.
- [27] Walker GC. The SOS response of *Escherichia coli*. In: Neidhardt IFC, (Ed). *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*: 2nd ed. Washington DC: ASM Press, 1996, pp.1400–1416.
- [28] Marthi B, Shaffer BT, Lighthart B, *et al.* Resuscitation effects of catalase on airborne bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, **57**(9): 2775–2776.
- [29] Bloomfield S, Stewart G, Dodd C, *et al.* The viable but non-culturable phenomenon explained. *Microbiology*, 1998, **144**(1): 1–3.
- [30] Ferguson RL, Buckley EN, Palumbo AV. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, **47**(1): 49–55.
- [31] Kopylov A, Kosolapov D, Zobotkina E. Distribution of viruses and their impact on bacterioplankton in mesotrophic and eutrophic reservoirs. *Inland Water Biology*, 2008, **1**(1): 46–53.
- [32] T Bouvier PAdG. Key role of selective viral-induced mortality in determining marine bacterial community composition. *Environmental Microbiology*, 2007, **9**(2): 287–297.
- [33] Lewis K. Programmed death in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, **64**(3): 503–514.
- [34] Eilers H, Pernthaler J, Peplies J, *et al.* Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(11): 5134–5142.
- [35] Simu K, Holmfeldt K, Zweifel UL, *et al.* Culturability and coexistence of colony-forming and single-cell marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(8): 4793–4800.
- [36] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 2002, **296**(5570): 1127–1129.
- [37] Weaver JC, Bliss JG, Powell KT, *et al.* Rapid clonal growth measurements at the single-cell level: gel microdroplets and flow cytometry. *Nature Biotechnology*, 1991, **9**(9): 873–877.
- [38] Zengler K, Toledo G, Rappe M, *et al.* Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, **99**(24): 15681–15686.
- [39] Akselband Y, Cabral C, Shapiro DS, *et al.* Rapid mycobacteria drug susceptibility testing using gel microdrop (GMD) growth assay and flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, **62**(2): 181–197.
- [40] Manome A, Zhang H, Tani Y, *et al.* Application of gel microdroplet and flow cytometry techniques to selective enrichment of non-growing bacterial cells. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, **197**(1): 29–33.
- [41] Akselband Y, Cabral C, Castor TP, *et al.* Enrichment of slow-growing marine microorganisms from mixed cultures using gel microdrop (GMD) growth assay and fluorescence-activated cell sorting. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, **329**(2): 196–205.
- [42] Eilers H, Pernthaler J, Amann R. Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(11): 4634–4640.
- [43] Josep MG, Morán XAG. Effects of filtration on bacterial activity and picoplankton community structure as assessed by flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, 1999, **16**(3): 251–264.
- [44] Bussmann I, Philipp B, Schink B. Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, **47**(1): 41–50.
- [45] Bruns A, Nubel U, Cypionka H, *et al.* Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(4): 1980–1989.
- [46] Zweifel UL, Hagstrom A. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (Ghosts). *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(6): 2180–2185.
- [47] Luna GM, Manini E, Danovaro R. Large fraction of dead and inactive bacteria in coastal marine sediments: comparison of protocols for determination and ecological significance. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(7): 3509–3513.
- [48] Proctor LM, Souza AC. Method for enumeration of 5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride (CTC)-active cells and cell-specific CTC activity of benthic bacteria in riverine, estuarine and coastal sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, **43**(3): 213–222.
- [49] Pernthaler J, Glockner FO, Unterholzner S, *et al.* Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(11): 4299–4306.
- [50] Labrenz M, Brettar I, Christen R, *et al.* Development and application of a real-time PCR approach for quantification of uncultured bacteria in the central Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(8): 4971–4979.
- [51] Bollmann A, Lewis K, Epstein SS. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(20): 6386–6390.