

除元基因组方法外, 研究未培养微生物的另一种策略是改进现有培养技术和培养方法, 最大限度地满足微生物的生长需求, 力求在实验室能够培养更多的微生物物种。

刘双江

环境微生物培养新技术的研究进展

王保军 刘双江*

(中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101)

摘 要: 遍布于地球上各种生境中的微生物具有丰富的物种多样性。迄今为止, 能够在实验室条件下培养的微生物仅仅是其中的一小部分, 微生物物种的绝大多数还都难以在现有培养技术和条件下进行繁殖和生长。人们把那些尚未在实验室获得培养生长的微生物称之为未培养微生物(Uncultured microorganisms)。本文概述了一些制约微生物培养生长的影响因素, 重点介绍了近年来出现的一些新颖独特的环境微生物培养技术和方法, 包括稀释培养法、高通量培养技术、模拟自然环境的扩散盒技术、土壤基质膜装置、细胞微囊包埋技术等。此外, 本文还总结了通过改善微生物培养条件、设计开发新型的微生物培养基等方面取得的令人瞩目的进展。这些新颖培养技术和培养方法的出现, 显著提高了微生物的可培养性, 发现和鉴定了许多新的微生物物种, 极大地丰富了可培养微生物的多样性和微生物资源, 并为深入研究和开发微生物奠定了良好的资源研究基础。

关键词: 环境微生物, 未培养微生物, 新培养技术

*通讯作者: ✉ liusj@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2012-11-09; 接受日期: 2012-11-30

Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms

WANG Bao-Jun LIU Shuang-Jiang*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Microorganisms are widely distributed in various habitats of the earth, and their species diversity is tremendous. However, only a small portion of their representatives are cultivated with the current technology. Those microbes that are not cultivated under laboratory conditions are termed “uncultured microbes”. Uncultured microbes are the majority of the microbial diversity. This review summarizes the recently developed cultivation techniques for microorganisms, with focuses on techniques such as “dilute to extinction culture”, “high-throughput culturing”, “diffusion chambers”, “soil substrate membrane system”, and “single cell encapsulation”.

Keywords: Environmental microorganisms, Uncultured microorganisms, Novel cultivation approaches

微生物培养技术的形成, 奠定了微生物分类、生理、遗传等当代微生物学各个领域发展的基础。分子生物学技术和显微观察技术的发展, 展示了一个更为丰富多彩的微生物世界, 对微生物培养技术提出了新的挑战和机遇。研究和分析表明^[1-2], 自然界中绝大多数微生物在现有条件下尚不能被传统的微生物技术培养出来, 依照现有的培养技术和方法, 不同生境微生物可培养率的检测结果是: 海水中约为 0.001%–0.1%, 淡水中约为 0.25%, 土壤中约为 0.3%, 活性污泥中约为 1%–15%。人们把那些在现有培养技术条件下尚未获得培养生长的微生物泛称为未培养微生物(Uncultured microorganisms)^[3-5]。

现有的微生物技术方法具有很大的局限性, 例如在细菌域所涵盖的 61 个类群(Phyla, 门或相应的分类单元)中, 可培养的类群(Phyla)约为 30 个, 其余均为非培养类群^[6]。为了克服现有培养

技术方法的局限性, 研究者开发出一系列不依赖微生物培养技术的研究方法, 例如变性梯度胶电泳(DGGE)、荧光标记细菌寡核苷酸探针细胞原位杂交(FISH)、环境样品中细菌 16S rRNA 基因文库构建和序列分析、DNA 芯片、宏基因组测序分析等。不过, 该类方法也同时带来本身固有的弊端。例如, 对微生物从细胞水平上呈现出的形态特征、生理特性、代谢功能、环境胁迫效应的生物应答等, 难以进行实验研究, 致使无法准确了解微生物细胞的生命活动; 难以对微生物群落中不同种群间的相互作用、相互协调的动态过程 and 变化规律进行科学描述和验证, 进而无法对环境微生物工艺过程进行准确设计、精细调控和高效利用^[7]。因此, 在利用分子生物学技术研究微生物多样性、开发环境微生物基因资源的同时, 需要不断研发新的微生物培养技术, 使以往被认为是不可培养的微生物源源不断地融入到可培

养的行列之中,才能真正深入和有效地研究和发现微生物生理遗传等生命规律,实现微生物资源的开发和利用。

1 制约微生物培养生长的因素

自然界中生长的微生物在现有培养条件下不能进行生长的制约因素,可归纳如下:

1.1 现有培养条件不能再现原生态环境条件

地球上微生物生存的环境类型多种多样,除了普通的自然环境外,还存在着各种极端环境,海洋热液喷口(Deep-sea hydrothermal vent)就是典型的极端生境之一。此类热液喷口一般位于800 m–5 000 m的深海处,与地球早期形成环境十分相似,具有高温(350 °C–400 °C)、高压(80–500 MPa)、低pH(2–3)、缺氧、以及含有丰富的还原物质等特点。深海热液喷出后与海水迅速混合,通常会形成一个350 °C–0 °C的陡然变温地带,经过长期的生物进化,在60 °C–110 °C形成细菌和古菌分布带。尽管人们已经从中分离出一些微生物种群,然而,由于这种极端环境条件下的众多复杂因素,特别是深海高压的限制,人工条件下还无法完全模拟自然环境,因此,许多微生物仍然是不可培养的,对其物种多样性和系统发育树的研究主要依赖于分子生物学的方法^[8]。

此外,即便是普通的自然环境,由于人工条件所限,也无法完全还原真实场景。为了实现既定的研究目的,人们通常将微生物限定在营养基质简单、通气、温度、pH等参数恒定的条件下培养,许多微生物就此丧失了自由生长的必要条件,从而表现为不可培养^[9]。

1.2 人工培养环境忽视或破坏了原生境中微生物的生态关系

天然生境种群间关系繁多复杂,诸如拮抗、寄生、协同作用、互养共栖、共代谢等,其中后

两种作用是微生物在自然界中重要的生存模式之一。在环境中,共代谢对于建立两个种群间的偏利共生关系起着很重要的作用,尤其在农药、人工合成染料、石油烃类等有机污染环境中,通常作为生物降解的重要途径^[10]。此外,微生物群落中存在的群体感应(Quorum sensing)也是非常重要的,微生物通过信息交流来判断群体密度大小和生长环境中出现的变化,进而启动相应的基因做出统一协调的应答。通常被称为细胞内生命第二信使的环磷酸腺苷(cAMP),以及大多数革兰氏阴性细菌密度感应系统的酰基高丝氨酸内酯等,都是细胞间沟通的信号分子^[11]。然而,在人们进行常规的微生物分离培养过程中,通常会忽视这些群体效应。其结果就是,当微生物从自然环境骤然转到人为设置的培养环境中时,原生境中的生态依存关系遭到破坏,菌群间的生物信息交流体系也会发生根本性的改变,适应性强的物种生长迅速,而生长缓慢的微生物类型则因营养物的匮乏以及种群信息流通的障碍而受到抑制^[12]。在长期的微生物培养实践中,我们也注意到,一些最初能在人工培养基中以混合培养方式生存的种类,在分别转接到同样的培养基中进行纯化时,因无独立生长的能力而不能存活。

1.3 人工营养基质浓度过高或氧化环境的压力

以传统方法培养时,通常采用营养丰富的培养基,以期达到微生物快速生长和最大生物产量,结果分离的大多为生长迅速且偏爱丰富营养的微生物。而在自然界中,除了一些利用高浓度营养物的微生物种群外,其余大部分是以中低营养甚至是寡营养方式生活的。例如海洋环境中的一些专性寡营养微生物,生长环境中的有机碳水平为数毫克/升,具有高效的营养吸收机制,在低营养浓度以下,依然可以吸收足够的有机质来维持生长。当微生物从自然环境转移到营养丰富的人工培养基中时,一些摄取营养能力强的微生物

会应运而生,而寡营养的微生物就会因高浓度营养物基质的抑制而停止生长^[13]。

另外,自然环境中的微生物在人工培养基上好氧条件培养时,一些适应性强的种类迅速生长,在生长代谢过程中产生大量的过氧化物、自由基和超氧化物,结果使生长速率较慢或适应能力较差的微生物受到毒害抑制,或者处于休眠状态,乃至死亡^[14]。

1.4 其他影响因素

(1) 缺乏潜在的外源活性物质。微生物在自然生境中通常需要一些生命活动所需的活性物质,例如,在水环境中,作为生命活动能量直接来源的三磷酸腺苷(ATP)浓度可达 1 nmol/L,很可能源自浮游植物和其他浮游生物。另外,藻类分泌的生长因子和维生素对许多细菌的生长也是必不可少的;此外,一些植物、动物病原菌对寄主活性物质的依赖在常规培养条件下是难以实现的^[10]。

(2) 生长缓慢,判断标准不敏感。有些生长缓慢的微生物在平皿上形成只有很少细胞聚集的微小菌落,不易被眼睛直接观察到,自然表现上也就被判断为不可培养。

(3) 病毒感染导致的培养效率降低。某些海洋环境样品,7%的菌群携带病毒,表层海水死亡细菌中约 10%–50%是由于病毒感染造成的。而且,病毒选择性感染会导致微生物种群组成的改变,被溶源性病毒感染的细菌在营养丰富的平皿上培养时,也会因诱发病毒增殖而出现死亡^[13]。

上面列举了一些微生物不可培养或难培养的原因,从根本上来说,一是由于客观条件限制,还不可能人为全面地还原其真实的生长环境,而更重要的是由于人们对微生物生长环境的复杂性、微生物生长条件及其规律性的了解还非常有限所致。针对这些缺陷,研究者已经陆续研发出一系列改善微生物培养的新方法。

2 改善微生物培养的新方法

2.1 稀释培养法(Dilution culture)

在地球上,许多生境处于低营养或寡营养的状态,海洋就是典型的寡营养环境之一,海洋中占主体的寡营养微生物,在人工培养时往往受到少数优势生长微生物的竞争而不能正常生长^[14]。

针对这种缺陷,1993年,Button等^[15]提出,当把海水中微生物群体稀释至痕量时,海水中的寡营养微生物可以不受少数几种优势微生物竞争作用的干扰,被培养的可能性会大大提高。作者采用稀释培养法结合流式细胞仪计量研究了海洋细菌的多样性,结果表明,稀释培养9周后的微生物细胞浓度可达到 $10^4/\text{mL}$,细胞的倍增时间差异明显,短的只需一天,长的可达一周。同年,Schut等^[16]采用稀释培养法研究了北美阿拉斯加复活湾和荷兰北海海域的海洋细菌多样性,分离到37株兼性寡营养细菌和15株专性寡营养细菌。之后,采用过滤蒸汽灭菌的海水作为培养基,分离到典型的海洋细菌 *Sphingomonas alakensis* (菌株 RB2256)。

该种稀释培养方法同样也被应用于淡水湖泊的微生物生态学研究中。2005年,戴欣等^[17]在研究我国太湖水环境富营养化的过程中,比较了水体细菌在普通培养基和稀释培养基上的分离效果,发现在稀释培养基上生长的细菌数量是富营养的牛肉汁蛋白胨琼脂培养基上生长数量的3–5倍。采用这种稀释培养技术,研究者从太湖水环境中分离出3株新的细菌,经系统细菌分类学鉴定,分别定名为太湖柄状细菌(*Asticcaulis taihuensis*),太湖新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium taihuense*),以及对NaCl敏感的黄杆菌属的一个新种(*Flavobacterium saliperosum*)^[18–20]。

2011年,Kenters等^[21]将羊胃中的微生物样品液稀释至极限梯度(10^{-10} – 10^{-12})后,接种到一

种自制的含有羊胃内容物的接近原生境的培养基中培养,在长有细菌的近 140 个试管中,58% 的为纯培养,大部分菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 88%–94%,均为未报道过的新种或新属。

2.2 高通量培养技术(High-throughput cultivation, HTC)

为了提高细菌的分离效率,Connon 等^[22]在稀释培养法的基础上提出高通量培养技术,该方法是将样品浓度稀释至 $10^3/\text{mL}$ 后,采用 48 孔细胞培养板并结合流式细胞仪检测分离培养微生物。高通量培养技术可将样品中 14% 的微生物纯化培养出来,远高于传统分离技术所培养的微生物数量,并且发现了多种独特的未培养海洋变形菌门的类群,其中, SAR11 纯培养的获得是寡营养微生物培养技术的成功范例,占海水表面原核生物组成 1/3 的 SAR11,此前只以基因序列的形式存储在原核生物 16S rRNA 基因文库中。2003 年, Rappé 等^[23]结合荧光原位杂交技术(FISH),对高通量培养法进行了改进,检测到了 SAR11 类群海洋细菌的存在,在较短时间内对目标微生物进行了大量的培养,并获得 11 株菌,定名为新月型菌,这是目前已知最小的营自由生活的生物之一,菌体大小只有 $0.01\ \mu\text{m}^3$ 。Cho 和 Giovannoni^[24]采用该技术从太平洋近岸和深海中培养出 γ -变形菌纲中的 44 种新菌株。该方法不仅有效的提高了微生物的可培养性,还可在短期内监测大量的培养物,大大提高了工作效率。

2.3 模拟自然环境的培养技术

2.3.1 扩散盒培养技术(Diffusion growth chamber): 为了能够让海洋微生物在原位条件下富集生长,最终得到纯培养的微生物, Kaeberlein 等^[25]在分离培养海岸潮间带底泥中的微生物时,使用一种新颖的名为扩散盒的自制培养仪器,它是由一个环状的不锈钢垫圈和两侧胶连的孔径为 $0.03\ \mu\text{m}$ 的滤膜组成,滤膜只允许培养环境中的

化学物质流通而不能让细胞通过。扩散盒内加入稀释底泥与琼脂的混合物,封闭后置于鱼缸底部的天然海洋底泥上培养,并不断注入新鲜的海水循环流动。培养 1 周后,培养基上产生大量的微型菌落,数目高达接种微生物的 40%,并从海水中分离到一株新的细菌, 16S rRNA 基因序列比对结果表明,与之亲缘关系最近的细菌 *Lewinella persica* 的序列最大相似性只有 93%。有意思的是,该菌株不能在人工合成培养上单独生长,而要在其他海洋细菌共存的条件下才能形成菌落,并因此获得几株类似起着协同功能的细菌。

Ferrari 等^[26]受扩散盒技术原理的启发,设计了一种土壤基质滤膜系统(Soil substrate membrane system, 简称 SSMS)分离土壤中的难培养微生物,该方法利用倒置的组培嵌入池(Tissue culture insert, 简称 TCI)装置,结合荧光原位杂交(FISH)检测技术,从土壤中成功的分离出原非培养的 TM7 种类的细菌。

2007 年, Bollmann 等^[27]利用扩散盒培养法相似的原理,研究了水体和污泥环境中的难培养微生物。培养 4 周后,取出混匀,一份在普通培养基上培养,另一份延续前一轮的扩散培养程序,再培养 4 周,该培养实施 4 个流程,第二周期培养效果最好。应用此种改进技术,研究者从环境样品中分离出许多常规方法很难分离的微生物,诸如 δ -变形菌、疣微菌门(Verrucomicrobia)、螺旋体(Spirochaetes)和酸杆菌门(Acidobacteria)的细菌。2010 年, Bollmann 等^[28]利用扩散盒培养法从污染水体的沉积物中分离得到包括 α 、 β 、 γ 变形菌纲,放线菌门,厚壁菌门等许多纯培养菌株,菌群结构呈现出丰富的多样性特征。

应当指出,扩散盒技术初次培养获得的微小菌落多数为混合培养,通常需要再次分离,才能获得纯培养。该方法的特点是:模拟自然环境,不同细胞间经过互喂(Cross-feeding),形成独立

的菌落。

2.3.2 细胞微囊包埋技术(Microencapsulation):

细胞微囊包埋法是近年来出现的一种将单细胞包埋培养与流式细胞仪检测结合为一体的高通量分离培养技术。Zengler 等^[29]将海水和土壤样品中的微生物先进行稀释, 与融化的琼脂糖混合, 然后在专门的搅拌器中用油乳化, 形成直径 30 μm –50 μm 的微滴, 其中 10% 的胶滴会含有单个细胞。之后, 将包埋胶囊装入层析柱内, 层析柱进口端用 0.1 μm 滤膜封住, 防止外部细菌的进入而污染层析柱, 出口端用 8 μm 滤膜封住, 低浓度的有机物培养液连续通过层析柱对包埋胶囊进行流态培养, 未被包埋的游离细胞则随培养液流出柱外。结合流式细胞仪进行检测, 将长有单菌落的胶囊分选到加有丰富培养基的 96 孔板中继续培养, 最终获得纯培养微生物。细菌 16S rRNA 基因序列分析比对结果表明, 在 150 株细菌中, 超过半数以上的菌株是此前未被培养的, 而且在细菌环境基因组文库中也没有存储。进一步研究表明, 该种高通量的培养技术可从每个样品中分离出 10 000 多株细菌和真菌^[30]。

2009 年, Ben-Dov 等^[31]报道了一种双层包埋技术, 先将微生物包装在琼脂球内, 外面再用一种多羧基高分子膜包裹, 将这种双层包裹的小球放在一种雌性石芝珊瑚的表面粘液层中培养, 获得许多新的微生物, 与已知细菌序列比较, 最大相似性只有 85%–96%。Nichols 等^[32]设计了一种高通量的微生物分离芯片(Ichip)方法, 每个芯片包含有数百个微型扩散孔, 每个扩散孔只含有一个微生物细胞。采用该种芯片装置, 分离到大量的海水和土壤微生物, 其中序列最大相似性小于 95% 的新种分别占 28.3% 和 28.7%。

细胞微囊包埋法的优点是: 在接近于天然生长的环境中有效地提高了微生物的可培养性, 但由于该方法建立时间较短, 还存在一些如包埋基

质机械强度低, 透性差、微生物热敏感等技术问题, 且成本较高, 在国内也还处于实验研究阶段, 尚需不断的改进^[33]。

2.4 改良微生物培养基组成和培养条件

微生物多样性表现出生理代谢的多样性及复杂性, 不同的微生物生长代谢类型不同, 对反应的底物要求也存在差异。因此, 根据微生物的某些特性, 在传统的培养方法基础上, 有选择性的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为可培养的, 已报道的方法如下:

(1) 添加包括非传统的碳源、电子供体或电子受体: Santiti 等从澳大利亚金矿中分离出以亚砷酸盐为电子供体, 氧为受体, CO_2 为唯一碳源的化能自养菌 NT-26, 细菌 16S rRNA 基因序列比对结果表明, 该菌有可能是 α -变形菌纲中的一个新种^[10]。同年, Schink 等^[34]在厌氧条件下, 从海底沉积物中分离到能够以亚磷酸为电子供体, 硫酸盐为电子受体的一种新的无机化能自养细菌, 鉴定为亚磷酸氧化产脱硫菌。Uphoff 等^[35]对欧洲北海海水样品微生物多样性的研究中发现, 在添加多种碳源和复杂化合物的培养基上生长的微生物种类和数量都要多于单一碳源培养基, 在单一碳源培养基上生长的几乎都是变形菌门的细菌, 而多碳源的复合培养基则分离到 4 种其他门类的微生物。Kashefi 等^[14]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, 明显改善该种培养物的生长状况。2006 年, Raghoebarsing 等由特殊的原核生物生态群落催化的新型还原产物用于丰富传统培养基的类型, 并且发现了新种类的微生物^[36]。应该指出, 采用这种方式改善难培养微生物的前提是要对目的微生物生理特性具备一定的了解。

(2) 根据微生物自身特性的培养方法: 海洋微生物中的一些培养类群有可能具有独特的代

谢途径, 藉此将其以纯培养的方式分离出来。Konneke 等^[37]发现海洋泉古菌门(*Crenarchaeota*)的古菌具有通过铵的氧化产生能量的特性, 故此在培养基中添加铵盐并加入抗生素以筛除其他海洋细菌, 最终获得了海岸亚硝化侏儒菌(*Nitrosopumilus maritimus*) SCM-1 的纯培养, 这是海洋泉古菌 I 群古菌首次获得的纯培养。Morris 等^[14]发现, 称之为 SAR202 的微生物类群具有氧化卤代化合物的特性, 该类群属于绿曲挠菌门(*Chloroflexi*), 生活在海洋真光层以下。迄今, 该进化支还未获得海洋中分离的种类。

(3) 添加信号分子或类似物调节促进微生物生长: 鉴于自然生境的微生物群体之间需要有信息传递来维系调节生长和代谢, 在进行人工培养时, 可向培养系统中添加一些有益于细胞间沟通的信号分子, 诸如用于多种基因调控的信号分子环磷酸腺苷(cAMP), 以及大多数革兰氏阴性细菌密度感应系统的酰基高丝氨酸内酯(AHL)等。近期, 人们又在一种光合细菌, 沼泽红假单胞菌中发现了具有密度感应功能的信号分子, *p*-coumaroyl-高丝氨酸内酯^[38], 这对于改善微生物的培养状况都是很有益的。

另外, 一些短肽分子也有类似的促进其他细菌生长的作用, 2008 年, 研究者将一种由五个氨基酸组成的短肽 LQPEV 加入到普通的培养基中, 浓度为 3.5 nmol/L, 结果使一种难培养的嗜冷菌 *Psychrobacter* sp. MSC33 恢复了正常生长, 研究者认为, 这种短肽分子也具有信号肽的功能^[39]。

20 世纪末, Mukamolova 等发现藤黄微球菌能够分泌一种促进复活因子(Resuscitation promoting factor, Rpf)的细菌蛋白, 能有效地促进处于休眠期的革兰氏阳性细菌的复苏和生长, 其作用机制可能是参与了细胞间的信号转导, 类似于真核生物的生长因子。除了藤黄微球菌外, 该物质还在一些革兰氏阳性细菌诸如结核分枝杆

菌、谷氨酸棒杆菌中发现, 研究者认为, 该种功能因子有可能广泛存在于原核微生物中, 添加此种功能蛋白, 有助于调节或增强环境中处于 VBNC (活的但不可在常规条件下培养)状态的微生物的可培养性^[40-41]。

(4) 添加细菌实施仿原生境共培养: 根据自然生境中许多细菌依靠共生关系维系生长的原理, Burmolle 等^[42]设计了一种双层细菌培养基。即先倒一层培养基; 凝固后, 涂布已知的细菌菌液; 干后, 再倒一层培养基; 最后, 涂布环境样品稀释液, 利用这种培养方法, 获得了高于普通单层培养基 20%-40%的菌落数。该方法的优越性在于模仿原生态菌群生长关系, 有益于促进同类甚至不同种类细菌的生长代谢。

(5) 添加具有解毒功效的化合物或酶制剂: 环境中的某些优势微生物种类, 在生长过程通常会产生 H_2O_2 等过氧化物及其他有毒物质。为了减少这种毒性作用, 研究者在培养体系中添加了解毒功效的化合物或者酶制剂, 例如过氧化氢酶、超氧化物歧化酶(SOD)、甜菜碱、丙酮酸钠、 α -酮戊二酸等过氧化氢降解物、以及抗氧化剂二巯代二丙酸等, 可使处于活的但是不能培养状态的微生物得到不同程度的恢复^[43]。岳秀娟等^[44]在培养基中加入丙酮酸钠、过氧化氢酶等生化试剂, 生长的菌落数比未加的对照组高出 25%-42%, 并从改良培养基平板上生长的微小菌落中分离到多株具有抗菌活性的放线菌和真菌, 为微生物医用药物的筛选和菌种保藏提供新的可选途径。

(6) 设计新型的培养基: 针对环境分离源的生境特征, Janssen 和 Davis 等^[45-46]设计了更加接近于原生环境条件的 DNB、V55、VxylA、VxylG 等多种类型的培养基, 当中添加有微量元素、氨基酸、维生素、小分子有机酸以及多种单糖、寡糖等, 并用结冷胶(Gellan gum)代替琼脂作为

支持剂, 连同调整 pH、延长培养时间等诸多因素, 从环境样品中分离出在常规培养基上未能分离的酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、浮霉菌门(Planctomycetes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)等许多难培养的微生物种群。

张佳月和刘兴宇等借鉴上述的培养改良策略, 针对森林土壤样品富含腐植质的酸性环境特征, 设计了 VaM 和 V3M 等 4 种新型培养基, 从我国东北长白山林区土壤中分离纯化出各种细菌共计 78 株, 其中 17 株是潜在的细菌新种, 与 GenBank 中已知菌株 16S rRNA 基因的最大相似性小于 97%, 经多项分类学系统鉴定, 其中 6 株细菌分别被鉴定为土壤壤球菌(*Agrococcus terreus*)、土壤类诺卡氏菌(*Nocardioides terrea*)、长白山新鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas changbaiensis*)、土壤弗拉托菌(*Frateriuria terrea*)、以及 *Adhaeribacter terreus*、*Phycococcus cremeus*^[47-52]。新菌株具有一些共同的特点: 多数生长在低浓度营养培养基上, 生长 pH 5.5, 培养时间较长, 有的菌株在最适的环境下也需要 3-4 d, 在结冷胶(Gellan)为支持剂的培养基上, 有些菌株生长效果比在琼脂平皿上效果好。

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

针对海洋浮游生物种类繁多且大小不一的特点, 为了获得目的微生物, 研究者在细菌分离培养之前, 增加了一个预过滤步骤, 经分级过滤去除大的丝状菌, 以及海水中有可能会出现细菌种群, 最后收集经 0.22 μm 微孔滤膜滤过的海水作为目的培养液。随后, 采取逐步增加营养物质浓度的方式使细菌逐步适应从寡营养过渡到标准营养浓度的生长培养基中。经此过滤适应培养法, 研究者从环境样品中获得 65 株细菌的纯培养, 经序列比对, 其中 88% 的序列相似性小于

97%, 而采用常规的标准培养程序, 同样的海水样品则未能分离出一株类似的细菌^[13]。该方法增加了可培养微生物的多样性, 今后, 采取适当调整过滤孔径, 将环境适应程序与其他方法例如稀释法结合的技术路线, 有可能获得更多的环境微生物新物种。

2.6 培养放线菌的新方法

放线菌门是细菌域中的主要类群, 也是产生抗生素的重要来源。为了从环境中获取更多的放线菌资源, 2008 年, Gavrish 等^[53]报道了一种专门筛选放线菌的新方法。将装有灭菌琼脂的塑料容器上下两边分别用两片具有半透性的薄膜密封, 上层膜的孔径为 0.03 μm , 下层膜的孔径为 0.2 μm , 环境中丝状的原核微生物就会选择性的刺入装置, 并生成菌落, 而丝状真菌则因膜孔径太小而被排除在培养装置外面。将该装置放置在土壤中, 室温黑暗条件下培养 2-3 周后, 将中间的琼脂层取出, 经镜检观察, 即可将生长的放线菌菌落挑出, 纯化。与常规的培养方法比较, 不仅获得大量丝状放线菌类, 种群多样性也更加丰富, 由此获得了一些非常罕见的放线菌类, 这种方法也可适用于海洋放线菌的分离纯化中。

海洋环境蕴藏着丰富的微生物物种多样性, 海洋放线菌有可能成为海洋药物和生物活性物质的重要来源, 改进和研发新的培养技术是实现这一宏伟蓝图的重要手段之一。近年来, 一种利用胆酸钠作为弱的表面活性剂, 连同超声波适度处理样品的分散差速离心法已经被人们所重视, 可使土壤或海底沉积物样品微粒更好的分散开, 经此处理获得的可培养海洋放线菌的数量比采用传统稀释涂布法明显增多^[54]。将海洋沉积物样品过夜干燥压碎后, 用灭菌的泡沫块直接在琼脂板上涂压, 或者将干燥的样品稀释后进行热处理, 筛选出新的放线菌菌株, 其中很多都是第一次发现的新属。有些研究者在培养基中加入海砂

或海泥的洗脱液,或者海洋无脊椎动物海绵的浸出汁液,获得了高比例的(82%–91%)的海洋特有的放线菌,此外,加入新生霉素(Novobiocin)也能明显提高海洋放线菌的比例^[55]。

3 结束语

综上所述,近年来,新颖的微生物培养方法和技术陆续问世,大致上可归纳为两类:一是在传统的培养基组成和培养方式上进行改良,包括添加微生物相互作用的信号分子,供应新型的电子供体和受体,降低营养基质浓度,延长培养时间以改善微生物的培养条件,促进低营养以及寡营养微生物种类的分离培养等;第二是设计仿原生境的高通量微生物培养技术和装置,诸如用于海洋环境和陆生环境的扩散盒技术,土壤基质膜技术以及高通量的微生物分离芯片等。这些技术的研发为当代微生物学的研究开拓出一片崭新的天地,许多曾经被认为是不可培养或极难培养的微生物业已成为可培养微生物大家庭的成员,极大地丰富了可培养微生物种群多样性的资源宝库,并为开发这些微生物资源奠定了良好的研究基础。

然而,尽管业已取得了上述令人瞩目的进展,人们也清醒地认识到,由于微生物生存环境的极其复杂性,未培养微生物数量巨大,种类繁多的现实性,因此,在探索微生物神奇世界的征途上仍旧面临着巨大的挑战。针对现今的研究状况,一些研究者提出^[9,13–14,56]:

(1) 在模拟自然环境条件,维持微生物种群间的相互关系,并集微生物的遗传、生理生化特性信息为一体的前提下,设计添加有仿原生境的微量元素、生长因子、微生物自然分泌的信号分子或促进复活因子的新型培养基,以及基于微生物相互作用的群体培养体系装置或反应器,有效的培养共生或互生微生物,是今后改善和提高微

生物可培养性的发展趋势;

(2) 另外,在尝试各种培养方法时,辅之以相应的高灵敏的观察、检测技术是非常重要的。通常,目的环境微生物成活率被低估的原因之一就是受传统检测方法的限制,因此,将荧光显微技术、流式细胞技术、细菌染色技术、可分辨环境样品中存活或者损伤或者死亡细胞的双链核酸染色技术等应用于环境微生物的检测中,能有效的提高可培养微生物的比例^[13,57]。

总之,由于微生物群落及其生存环境的复杂性,在进行新培养技术的研发和实际应用时,无需限定于其中的一种或一类方法,而应综合考虑,采用多种行之有效的技术方法。同时,新型培养技术的研发还应结合相关的分子生物学技术,以及其他学科的理论 and 实验技术,取长补短,相辅相成,藉此才能更好的拓展微生物的可培养性,通过不懈的努力,争取培养出更多的“未培养微生物”。

参考文献

- [1] Rappé MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority[J]. Annual Review of Microbiology, 2003, 57: 309–394.
- [2] 刘利. 未培养微生物的研究方法[J]. 贺州学院学报, 2007, 23(2): 119–121.
- [3] Stackebrandt E, Embley TM. Diversity of uncultured microorganisms in the environment[A]// Colwell RE, Grime DJ. Nonculturable Microorganisms in the Environment[M]. Washington DC: ASM Press, 2000: 57–75.
- [4] Newan DK, Banfield JF. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems[J]. Science, 2002, 296(5570): 1071–1077.
- [5] 焦瑞身. 新世纪微生物学者的一项重要任务——未培养微生物的分离培养[J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 641–645.

- [6] Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 309(1): 1-7.
- [7] 郭斌, 吴晓磊, 钱易. 提高微生物可培养性的方法和措施[J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 504-507.
- [8] 王丽玲, 林景星, 胡建芳. 深海热液喷口生物群落研究进展[J]. 地球科学进展, 2008, 23(6): 604-612.
- [9] 彭伶俐, 王琴, 辛明秀. 自然界中不可培养微生物的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(2): 75-79.
- [10] 胡俊, 万欢, 吴根福. 环境中未培养微生物的研究进展[J]. 农机化研究, 2007(8): 1-3, 38.
- [11] Nadell CD, Xavier JB, Levin SA, et al. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms[J]. PloS Biology, 2008, 6(1): e14.
- [12] 周玥, 刘小锦, 朱晨光, 等. 细菌中群体感应调节系统[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 122-126.
- [13] 田甜, 李冬梅, 戴世鲲, 等. 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.
- [14] 张秀明, 张晓华. 海洋微生物培养新技术的研究进展[J]. 海洋科学, 2009, 33(6): 99-104.
- [15] Button DK, Schut F, Quang P. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 881-891.
- [16] 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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(7): 2150-2161.
- [17] 戴欣, 王保军, 黄燕, 等. 普通和稀释培养基研究太湖沉积物可培养细菌的多样性[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 161-165.
- [18] Liu ZP, Wang BJ, Liu YH, et al. *Novosphingobium taihuense* sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(3): 1229-1232.
- [19] Liu ZP, Wang BJ, Liu SJ, et al. *Asticcacaulis taihuensis* sp. nov. stalked bacterium isolated from Taihu Lake, China[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(3): 1239-1242.
- [20] Wang ZW, Liu YH, Dai X, et al. *Flavobacterium saliperosum* sp. nov., isolated from freshwater lake sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(2): 439-442.
- [21] Kenters N, Henderson G, Jeyanathan J, et al. Isolation of previously uncultured rumen bacterial by dilution to extinction using a new liquid culture medium[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84(1): 52-60.
- [22] Connon SA, Giovannoni SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3878-3885.
- [23] Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, et al. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade[J]. Nature, 2002, 418(6898): 630-633.
- [24] Cho JC, Giovannoni SJ. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine γ -proteobacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 432-440.
- [25] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. Science, 2002, 296(5570): 1127-1129.
- [26] Ferrari BC, Winsley T, Gillings M, et al. Cultivating previously uncultured soil bacteria using a soil substrate membrane system[J]. Nature Protocols, 2008, 3(8): 1261-1269.
- [27] Bollmann A, Lewis K, Epstein SS. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(20): 6386-6390.
- [28] Bollmann A, Palumbo AV, Lewis K, et al. Isolation and physiology of bacteria from contaminated

- subsurface sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(22): 7413–7419.
- [29] Zengler K, Toledo G, Rappé M, et al. Cultivating the uncultured[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(24): 15681–15686.
- [30] Zengler K, Walcher M, Clark G, et al. High-throughput cultivation of microorganisms using microcapsules[J]. *Methods in Enzymology*, 2005, 397: 124–130.
- [31] Ben-Dov E, Kramarsky-Winter E, Kushmaro A. An *in situ* method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 68(3): 363–371.
- [32] Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, et al. Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of “uncultivable” microbial species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2445–2450.
- [33] 冀世奇, 刘晨光, 张晓华. 海洋微生物微包埋培养及应用研究进展[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2010, 40(4): 53–59.
- [34] Schink B, Friedrich M. Phosphite oxidation by sulfate reduction[J]. *Nature*, 2000, 406(6791): 37.
- [35] Upfoff HU, Felske A, Fehr W, et al. The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: a molecular screening of marine isolates[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 35(3): 249–258.
- [36] Raghoebarsing AA, Pol A, van de Pas-Schoonen KT, et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 918–921.
- [37] Konneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. *Nature*, 2005, 437(7058): 543–546.
- [38] Schaefer AL, Greenberg EP, Oliver Cm, et al. A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals[J]. *Nature*, 2008, 454(7204): 595–599.
- [39] Nichols D, Lewis K, Orjala J, et al. Short peptide induces an “uncultivable” microorganism to grow *in vitro*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4889–4897.
- [40] 李伦, 李元, 白婧, 等. 细菌复苏促进因子[J]. *动物医学进展*, 2010, 31(4): 103–106.
- [41] 丁林贤, 张萍华, 洪华嫦, 等. 藤黄微球菌 Rpf 活性蛋白的制取及其对红球菌 VBNC 菌体的复苏作用[J]. *微生物学报*, 2012, 52(1): 77–82.
- [42] Burmølle M, Johnsen K, Abu Al-Soud W, et al. The presence of embedded bacterial pure culture in agar plates stimulates the culturability of soil bacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 79(2): 166–173.
- [43] 曾建民, 曾振顺, 原红娟, 等. 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.
- [44] 岳秀娟, 余利岩, 李秋萍, 等. 自然界中难分离培养微生物的分离和应用[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(3): 77–81.
- [45] Jassen PH, Yates PS, Grinton BE, et al. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(5): 2391–2396.
- [46] Davis KER, Joseph SJ, Janssen PH, et al. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(2): 826–834.
- [47] Zhang JY, Liu XY, Liu SJ. *Agrococcus terreus* sp. nov. and *Micrococcus terreus* sp. nov., isolated from forest soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(8): 1897–1903.
- [48] Zhang JY, Liu XY, Liu SJ. *Nocardioides terrea* sp. nov., isolated from forest soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(10): 2444–2448.
- [49] Zhang JY, Liu XY, Liu SJ. *Sphingomonas changbaiensis* sp. nov., isolated from forest soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(4): 790–795.
- [50] Zhang JY, Liu XY, Liu SJ. *Frateruia terrea* sp. nov., isolated from forest soil, and emended description

- of the genus *Frateruia*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(2): 443–447.
- [51] Zhang JY, Liu XY, Liu SJ. *Adhaeribacter terreus* sp. nov., isolated from forest soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(7): 1595–1598.
- [52] Zhang JY, Liu XY, Liu SJ. *Phycococcus cremeus* sp. nov., isolated from forest soil, and emended description of the genus *Phycococcus*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(1): 71–75.
- [53] Gavrish E, Bollmann A, Epstein, et al. A trap for *in situ* cultivation of filamentous Actinobacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 72(3): 257–262.
- [54] 陈菲菲, 王勇, 王以光, 等. 海洋微生物来源的天然产物开发研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(2): 287–294.
- [55] 王宏梅, 赵心清. 可培养海洋放线菌生物多样性的研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 996–1000.
- [56] Alain K, Querellon J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges[J]. Extremophiles, 2009, 13(4): 583–594.
- [57] 潘虎, 卢向阳, 董俊德, 等. 未培养微生物研究策略概述[J]. 生物学杂志, 2012, 29(1): 79–83.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtb.cn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华珞等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2013-00-00; 接受日期: 2013-00-00

(下转 p. 157)

<http://journals.im.ac.cn/wwxtb.cn>