

## 未培养微生物分离培养技术研究进展

邢磊<sup>1,2</sup> 赵圣国<sup>1,2</sup> 郑楠<sup>1,2</sup> 李松励<sup>1,2</sup> 王加启<sup>1,2\*</sup>

- (1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室 北京 100193)  
(2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 农业部奶产品质量安全风险评估实验室(北京) 北京 100193)

**摘要:** 自然环境中的微生物具有多样性高的特点, 而 99% 的微生物使用传统的方法仍然是“不可培养的”, 并且能被培养的小部分微生物不能够代表微生态的多样性。因此, 确定新的微生物物种和功能仍然是目前的重要任务。本文将综述基于调整培养基、考虑微生物间相互作用、捕获分离培养、高通量分离培养来分离培养微生物群体中的未培养微生物的方法, 及功能性研究的进展情况。

**关键词:** 未培养微生物, 分离培养, 技术方法

## Advance in isolation and culture techniques of uncultured microbes: a review

XING Lei<sup>1,2</sup> ZHAO Sheng-Guo<sup>1,2</sup> ZHENG Nan<sup>1,2</sup> LI Song-Li<sup>1,2</sup> WANG Jia-Qi<sup>1,2\*</sup>

- (1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)  
(2. Ministry of Agriculture Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Dairy Products (Beijing), Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Microbes have the characteristic of high diversity in natural environment, but 99% of microorganisms remain “unculturable” by using traditional methods. Besides, the culturable fraction can't represent the diversity of micro-ecology. Therefore, the present tasks are to identify species and functions of new microorganisms. This article reviews some success in the isolation and cultivation of unculturable bacteria from complex bacterial communities and their functions researches, including modifying medium, microbial interactions, capture, isolation and cultivation and high-throughput cultivation.

**Keywords:** Uncultured microbes, Isolation and culture, Techniques

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31261140365, 31501981, 31430081)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-10-62816069; E-mail: jiaqi wang@vip.163.com

**Received:** May 10, 2017; **Accepted:** November 03, 2017; **Published online** (www.cnki.net): November 15, 2017  
**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31261140365, 31501981, 31430081)

**\*通讯作者:** Tel: 86-10-62816069; E-mail: jiaqi wang@vip.163.com

**收稿日期:** 2017-05-10; **接受日期:** 2017-11-03; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-11-15

自然环境中存在的微生物远远比目前所培养的微生物数量多<sup>[1]</sup>。此外,一些关于 16S rRNA 基因序列的分析和微生物培养研究证明,有大量的微生物没有对应的培养方法<sup>[2]</sup>。本文中所提到的“未培养”将用来描述之前在人工培养基中还没有被培养的微生物。研究发现自然界中能够被培养和分类的微生物只占很小比例,大约占 1%,也就是所谓的“大平板计数异常”(样品中微生物细胞的数量与营养培养基上形成的菌落数量并不相符,并且显微计数要明显高于菌落数量<sup>[3]</sup>)。同样地,来自环境栖息地的未培养微生物的比例据估计大约是 99%<sup>[4]</sup>。目前估计在细菌的 61 个门中有 31 个门是不能被培养的<sup>[5]</sup>。古菌中只有 54 种是可培养的,而且它们仅代表了复杂生物多样性的一小部分,49 个谱系中绝大多数都还是未培养的<sup>[5]</sup>。

未培养微生物不能被培养并不仅是由于低丰度,而且还包括一些抵制培养的特殊原因,包括温度、pH、氧利用率、营养来源等。此外,面对不利的生长环境,为了生存细菌可能进入了一种“有活性但不分裂的状态”或“休眠的状态”,也就是细胞是活着的但是不再分裂<sup>[6]</sup>,并且仅当外部的条件变得更加有利或提供了合适的生长因素和信号,细菌才能够复苏。近年来越来越多的证据表明,活性氧簇具有生长抑制效果,例如过氧化氢能够导致氧化应激和细胞损伤,由于在人工生长培养基中产生了过氧化氢,导致微生物的生长效率明显降低<sup>[7]</sup>。富营养培养基中的高浓度营养成分或细菌素以及混合培养时邻近细菌产生的其他类型抑制因子可能会对细菌生长产生抑制作用。同时,自然环境中细菌群体中的个体成员,特别是那些以生物膜形式出现,通过细胞间的小肽或群体感应产生信号进而出现细菌间互相协作和相互作用的现象<sup>[8]</sup>。与这一结论相似的是,生长在牙菌斑生物膜上的细菌个体间可以形成严格的和可再生的结构关联,这一现象暗示细菌个体之间有清晰的功能关联<sup>[9]</sup>。因此,当试图避开宿主群体和有利的互作网络单独分离纯菌,它们可能并不会生长。某些微生物生长过程需要共

培养细菌产生的信号和化学因子的刺激,因此这种刺激的缺乏可能是阻止体外分离培养微生物最重要的因素之一。同时,通过对 *Erysipelotrichia* 谱系进化树的研究发现,在进化的不同阶段都伴随着基因的缺失,进而引起代谢功能和形成内孢子能力的变化<sup>[10]</sup>,另外,候选种 *Saccharibacteria* (之前的 TM7)、SR1、WWE3 和 OD1,其中有一段小的基因组缺失了调控某个关键生物合成路径的基因<sup>[11]</sup>,这样的细菌可能仅生存在与宿主有紧密联系的表面或体内。例如最近培养的 *Saccharibacteria* 菌株 TM7x 与龋齿放线菌和细胞内的病原体惠普尔养障体形成了一种紧密的共生关系<sup>[12]</sup>,以上两类细菌都存在调控氨基酸合成路径的基因组缺失的情况。因此,分离这类依赖性强的细菌具有极大的挑战。

虽然分子生态学和宏基因组学已经明显增加了我们对于微生物多样性的了解,并且引导产生了许多有趣的假设,但是这些先进的技术也显示出我们距离充分阐明微生物多样性还很远。同时,考虑到许多基因储存在具有未知功能或错误注释的数据库中,仅使用宏基因组学的方法不能提供足够的信息去培养所有的微生物。实际上,只有通过细菌纯培养的研究才能充分地阐述其表型和基因型。考虑到微生物培养在现代微生物学中的重要性,分离培养未培养微生物仍然是优先考虑的思路。因此,一个重要的挑战就是如何克服目前存在的限制因素,扩大可培养的范围。本文将综述目前未培养微生物分离培养技术研究进展(表 1),为分离未培养微生物和研究其生态学功能提供参考。

## 1 未培养微生物的限制因素

### 1.1 培养基组分和生长条件不全面

任何微生物的生长都需要能量、营养和适当的物理化学成分,并且不同的微生物所需的浓度是不同的。某些微生物在生长的过程中,需要特殊的营养物质、pH 条件、培养温度和合适的氧气浓度。Köpke 等研究不同的培养基基质和培养条件对微生物生长的影响后发现,不同的条件下微生物生长出现明显差异<sup>[21]</sup>。

表 1 微生物分离培养新方法  
Table 1 New culture and isolation methods of microbial

分类 Classification	培养方法 Culture methods	方法描述 Method description	参考文献 References
调整培养基 Adjustment medium	改良培养基	通过改变培养基组分, 添加一些特殊的化学物质等	[13]
群体培养 Mass culture	共培养	使用混合菌株培养需要协作生长的未培养细菌	[14]
	原位培养	模拟微生物生存的自然环境进行原位培养。采用扩散生长盒, 分离芯片等进行培养分离	[15]
细胞捕获 Cells capture	单细胞捕获分离	利用拉曼光谱仪等设备对特征细胞进行分离	[16]
	荧光激活细胞分离技术	通过对某一类微生物设计特异性探针, 利用荧光显微镜或流式细胞仪进行分离	[17]
高通量分离培养 High-throughput isolation cultivation	培养组学	利用多重培养条件、将培养的大量菌落进行分离与分析	[18]
	微液滴培养法	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	[19]
	生物反应器培养法	一种创新的高通量微型生物反应器(一个机械性驱动的生物反应器系统), 自动化小规模反应器(SimCell™)平台用于流加培养, 该平台控制 pH、溶解氧、葡萄糖	[20]

1.2 忽视了环境中微生物之间的相互作用

自然环境中的大部分微生物都是群体生活, 并且相互之间建立了复杂的关系。在实验室培养条件下, 单纯地将待培养的微生物与其他相关的微生物群体分开, 物种之间的信息交流被阻断, 微生物因缺乏必需的生长因子和信号分子而无法生长, 表现为不可培养。在原核生物中, 种间互作普遍存在并且不会受到信号分子的限制, 例如自体诱导分子 2 (AI-2)和 N-酰基-高丝氨酸内酯<sup>[22]</sup>。

1.3 培养时间短

在某些情况下, 培养效率随着培养时间的延长而明显增加。许多微生物, 特别是生活在营养不充足环境中的微生物生长速率是很慢的。因此, 延长培养时间是提高这类微生物培养效率的先决条件。Davis 等培养土壤微生物至少 12 周的时间, 结果显示菌落计数明显增加并且分离出几株之前未培养的菌株<sup>[23]</sup>。

1.4 检测灵敏性受限

对于某些微生物生长速率慢、产量低的情况, 如果检测技术灵敏性不高, 很可能得出错误的结论, 因此开发多种高灵敏性检测方法对于认识未培养微生物具有很大的作用。对于要通过菌落数量来

研究其生理生态特性的微生物, 高灵敏性的检测方法如切向流过滤是极其重要的<sup>[24]</sup>。

2 未培养微生物培养分离技术

2.1 调整培养基

在生长的过程中, 许多微生物有特殊的营养物质和化学物质的需求<sup>[25]</sup>。这就需要对微生物生存的自然环境和特性有深刻的理解, 包括与培养基生长直接相关的各种因素, 才能有助于研究者更好地理解这些因素并进一步开发培养未培养微生物的方法。最近的一些研究探究了不同成分和浓度的培养基对于培养未培养微生物的影响。Li 等应用体外培养方法, 在厌氧培养基中添加十八碳烯酸(TVA)至不同终浓度(0、30、40、50、60 μg/mL), 接种瘤胃微生物后进行连续和传代培养, 传代富集培养时, 用 DGGE 监测菌群变化, 发现当传至第 4 代, TVA 氢化菌群的数量增加最显著, 对差异条带的测序结果表明这些细菌大多属于未培养的瘤胃细菌<sup>[13]</sup>。Davis 等<sup>[23]</sup>和 Sait 等<sup>[26]</sup>参考系统发育相关菌种, 通过修饰和富集培养基成功地分离出之前未培养的微生物。微生物学家通过在培养基中加入氢氧化铁和锰氧化物作为电子受体, 实现了微生物的高效培养, 例如变形菌门、拟杆菌门、梭杆菌门、放线菌门、

厚壁菌门、酸杆菌门、疣微菌门和盐单胞菌门<sup>[21,27]</sup>。Kashefi 等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。该方法的前提是对微生物特性有一定的了解<sup>[28]</sup>。Santini 等从 Aodaliya 金矿中分出以亚砷酸为电子供体,氧为受体,以 CO<sub>2</sub> 为唯一碳源的优能自养菌(NT-26),16S rRNA 基因序列分析表明,NT-26 属于  $\alpha$ -Proteobacteria 土壤杆菌的一个根瘤菌分支,可能是一新种<sup>[29]</sup>。一些研究关注甲烷厌氧氧化对于硫酸盐或硝酸盐的还原作用。这些方法需要精确的培养基,其中包括碳氢化合物能量来源和硝酸盐,铁和硫酸盐作为电子受体<sup>[30]</sup>。

对来自北海的样本进行的研究显示,碳源的品质是决定培养效率的关键因素。包含不同碳源和复杂化合物的培养基所培养出的微生物数量和多样性比只含有一种碳源的培养基更高<sup>[30]</sup>。相反地,许多自养微生物不能在只有一种固定碳源的培养基中生长<sup>[31]</sup>。目前,通过使用低底物浓度的培养策略,针对未培养微生物的培养已经取得一些成

效<sup>[30,32]</sup>。放线菌门、酸杆菌门、变形菌门和疣微菌门利用低营养培养基和增加培养代数进而被成功地培养<sup>[33]</sup>。改善培养条件(如营养水平,氧气浓度,腐殖酸的添加和信号分子)也增加了一些新型微生物<sup>[34]</sup>。最近,科学家创新地开发出高选择性培养基,最大的优势是该培养基对特定的微生物具有高选择性。这种方法被用来开发选择性培养基培养水稻细菌性谷枯病菌、燕麦食酸菌、果胶杆菌、青枯雷尔氏菌和野油菜黄单胞菌<sup>[35]</sup>(表 2)。在培养基中添加腐殖酸、信号分子、处理活性氧的酶类<sup>[30,34]</sup>或移除某些抑制因子提高未培养微生物的培养性。一些微生物学家证实吉兰糖胶对于未培养的微生物的培养和分离是有效的,因为它的平板成分比琼脂要更清楚,因此更容易找到非常细微的菌落<sup>[33,36]</sup>。吉兰糖胶也可能增强受琼脂抑制的微生物的生长<sup>[36]</sup>。吉兰糖胶培养基上的菌落计数是琼脂培养基的 10 倍。生长在吉兰糖胶培养基上大约 60% 的微生物被认为是新的,在同样的条件下,新分离得到的微生物中的一半在琼脂培养基上不能形成菌落。

表 2 培养未培养微生物的稀释培养基的组分<sup>[35]</sup>  
Table 2 Composition of different diluted media used for culturing unculturable soil bacteria<sup>[35]</sup>

成分 Ingredient	培养基类型 Medium type (g/L)			
	0.01×NB	WSS <sup>a</sup>	VL55	VL70
2( N-吗啉基)乙磺酸 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid	—	—	1.95	2.09
牛肉膏 Beef extract	0.03	—	—	—
蛋白胨 Peptone	0.05	—	—	—
二水氯化钙 CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	—	—	44.11×10 <sup>-3</sup>	44.11×10 <sup>-3</sup>
磷酸氢二钾 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	0.40	—	—
七水硫酸镁 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	—	0.13	49.29×10 <sup>-3</sup>	49.29×10 <sup>-3</sup>
一水硫酸锰 MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	—	1.52×10 <sup>-3</sup>	—	—
硝酸铵 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	—	0.50	—	—
磷酸氢二铵 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	—	26.41×10 <sup>-3</sup>	26.41×10 <sup>-3</sup>
硫酸二铵 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	0.13	—	—
亚硒酸盐-钨酸盐溶液 <sup>b</sup> Selenite-tungstate solution <sup>b</sup>	—	—	1 mL	1 mL
微量元素 SL-10 <sup>c</sup> Trace element SL-10 <sup>c</sup>	—	—	1 mL	1 mL

注: <sup>a</sup>: 格雷斯基盐溶液(WSS); <sup>b</sup>: 氢氧化钠 0.5 g, 五水亚硒酸钠 3 mg, 二水钨酸钠 4 mg, <sup>c</sup>: 盐酸 10 mL, 六水氯化钴 190 mg, 二水氯化铜 2 mg, 四水氯化亚铁 1.5 g, 过硼酸钠 6 mg, 四水氯化锰 100 mg, 二水钼酸钠 36 mg, 六水氯化镍 24 mg, 氯化锌 70 mg, 蒸馏水 990 mL. —: 该培养基中没有此成分。

Note: <sup>a</sup>: Winogradsky's salt solution; <sup>b</sup>: NaOH 0.5 g, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O 3 mg, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 4 mg, Distilled water 1 000 mL; <sup>c</sup>: HCl 10 mL, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 190 mg, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2 mg, FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.5 g, NaBO<sub>3</sub> 6 mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 100 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 36 mg, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 24 mg, ZnCl<sub>2</sub> 70 mg, Distilled water 990 mL. —: No ingredient in the medium.

## 2.2 群体培养

**2.2.1 共培养:** 在自然环境的微生物区系中, 微生物间的相互作用对于群体生存是至关重要的, 但是由于内在的复杂性和实验室培养的困难性, 这些相互作用间的确切机制仍然是不清楚的。传统的以培养为导向的研究并不能解释由信号分子介导的相互作用, 这些信号分子严重地限制了对于未培养互养微生物的研究。因为微生物总是会在一个群体中与其他微生物建立一种关系, 并且这些相互作用一方能够竞争有限的资源, 另一方面也会通过代谢物和信号分子的交流进行合作<sup>[37]</sup>。微生物之间相互交流的典型的例子比如生物膜和多细胞培养装置, 都可以实施单个物种培养不可能实现的多功能培养。例如, 混合细胞组合能够完成多级纤维素降解, 并且产物中间体能被作为碳源进行利用<sup>[30]</sup>。Park 等开发了一种简易的微液滴装置用于高效培养互养微生物群体, 同时来证明其在微生物间协同共生中的效果<sup>[14]</sup>。微液滴装置是单分散液滴中封装和培养微生物群体中的小单元。如果液滴将有互作关系的微生物局部化, 那么这些微生物将能够分裂生长

(图 1A)。倾斜的 T 形连接用于液滴的产生, 反应室用于保留液滴进而进行培养(图 1B, C), 这个倾斜的 T 形连接能够产生均匀分散的液滴, 在入口的压力下, 至少 1 400 个液滴能够被非常紧密地包裹在 10 mm×5 mm 的反应室内(图 1D)。

共培养也是一种培养兼性或互养微生物的有效方法。到目前为止, 两种成功的例子已经被报道: (1) 一种利用透析膜反应器的群体培养方法已经成功地从厌氧淤泥中培养出厌氧嗜热的降解谷氨酸的微生物<sup>[38]</sup>。(2) 另一种利用在厌氧和需氧交替的间歇反应器中的群体培养成功富集到混合微生物<sup>[38]</sup>。新的微生物通过与耗氢型微生物共培养或使用适合生长的纯培养基质得以成功地鉴定<sup>[36]</sup>。另外, 在很多情况下, 不同技术结合使用已经取得了成功。例如, 通过将适合生长的环境条件与辅助菌株结合使用, Nichols 等培养出一种新的嗜冷杆菌属<sup>[39]</sup>。辅助菌株提供了必要的生长因子, 这些生长因子对于使用人工培养基培养未培养菌株是重要的发现。其他的研究者已经使用非共生的变形虫作为一种工具来分离环境样品中(包括土壤)新的胞内微生物<sup>[40]</sup>。

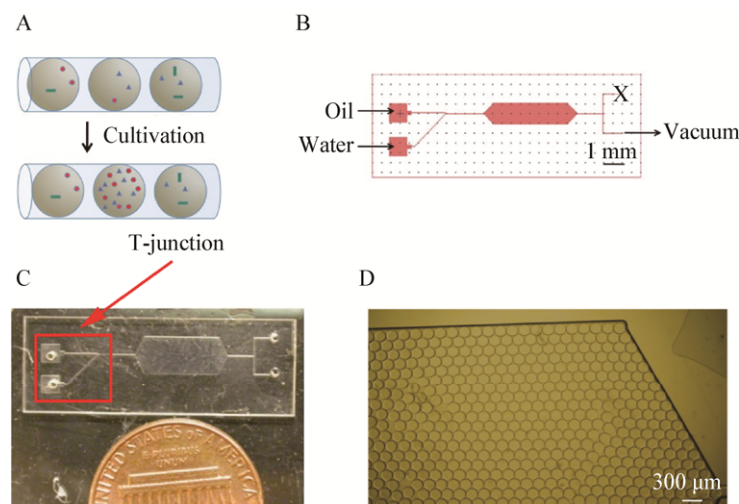


图 1 用于共培养的微流体装置<sup>[14]</sup>

Figure 1 Microfluidic device for microbial co-cultivation<sup>[14]</sup>

注: A: 利用共培养空间检测微生物间的共生关系; B: 微流体装置原理图; C: 微流体装置实物图; D: 微流体装置内液滴形成反应室。

Note: A: Compartmentalized co-cultures enable detection of symbiotic relations among community members; B: Schematic design of the microfluidic device; C: A picture of the microfluidic device; D: Droplets filling a large chamber in the microfluidic device.



**2.2.2 原位培养:** 模拟目标微生物的自然环境进行原位培养和分离是目前研究者的一个基本策略。Kaeberlein 等模拟海洋微生物自然生长的环境, 设计出名为扩散生长盒(Diffusion growth chamber)的自制培养仪器(图 2), 使用这种仪器来分离培养微生物<sup>[41]</sup>。该扩散盒由一个环状的不锈钢垫圈和两侧胶连孔径为 0.03  $\mu\text{m}$  的滤膜组成, 滤膜既允许有益的小分子代谢物质和圈内外微生物产生的活性物质透过膜自由进出小室, 化学物质在盒内和环境之间进行交流又不能使微生物细胞通过造成逃逸, 因此使高密度培养成为可能<sup>[41-42]</sup>。扩散盒内加入被分离的环境样品即海洋微生物样品与琼脂的混合物, 封闭后置于模拟采样点环境条件的玻璃缸中进行培养, 并不断注入新鲜的海水循环流动。1 周后, 培养基上产生大量形态各异的微型菌落, 数目高达接种微生物的 40%, 微菌落中多数为混合培养, 需再次分离以获得纯种。最后从海水中分离到一株新的菌株。不同类型膜基系统已经被开发出来在自然环境中直接生长微生物群体<sup>[41,43-45]</sup>。来自土壤、海洋或活性污泥中的未培养微生物被培养在扩散生长盒中。据此得出了这种假设: 在扩散生长盒里环境中原位培养的原核生物一方面进行充分的菌株富集为了随后的分离并移入传统的固体培养基, 另一方面在试管培养条件中使菌株适应抑制性的条件<sup>[45]</sup>。有趣的是, 很多缓慢生长的菌落应用该方法也可以被成功培养。研究者已经

在模拟的自然环境中通过使用扩散生长盒测试了未培养微生物的培养性并取得了成功的结果<sup>[32,41,43-45]</sup>。在此基础上, 科研人员开发了一种新的高通量平台用于大量培养和分离环境中的未培养微生物, 这种平台被称为分离芯片(Isolation chip, Ichip)。Ichip 由数百个微型扩散室组成, 每个室可接种单个的环境细菌。通过这种方法, 使研究者研究那些不能人工培养微生物成为可能。这种方法的合理性在于, 可以让一些自然生长因子通过扩散进入到培养室内, 从而有助于培养室内的细菌生长。结果表明, 通过这种方法分离到的细菌大大超过了传统分离方法得到的细菌。Nichols 等设计并测试一种分离芯片(Ichip)(图 3), 先把中央平板浸到目标细胞悬液中进行培养, 进而转到琼脂培养基中, 等培养基冷却后固定下来, 平板两边附上薄膜经过挤压彼此分开<sup>[15]</sup>(图 3)。通过这种芯片分离得到约 40%海水微生物种类和 50%土壤微生物种类, 其中海水样品中具有 62 个(28.3%)、土壤样具有 86 个(28.7%)纯培养微生物的 16S rRNA 基因相似性小于 95%<sup>[15]</sup>。这个方法可以用于大量且多样性高的微生物的分离培养。Jung 等开发了一种新技术, 采用 I-tip 方法使微生物和自然界的化学物质混合稀释进而能够让微生物在自然环境中利用这些物质生长, 利用原位培养手段培养出更具多样性的微生物群体, 缩小了可培养和未培养微生物间的距离<sup>[46]</sup>。

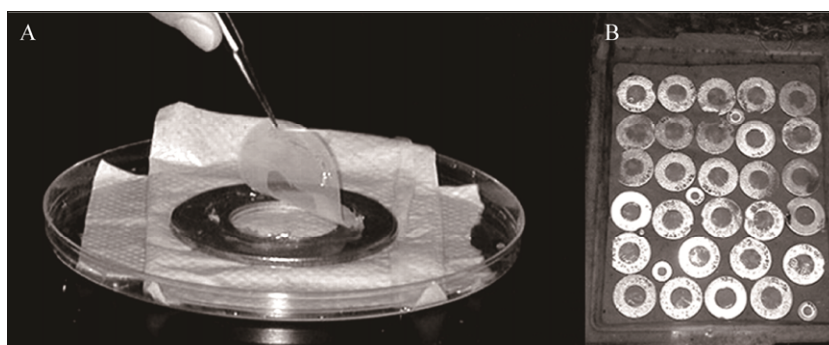
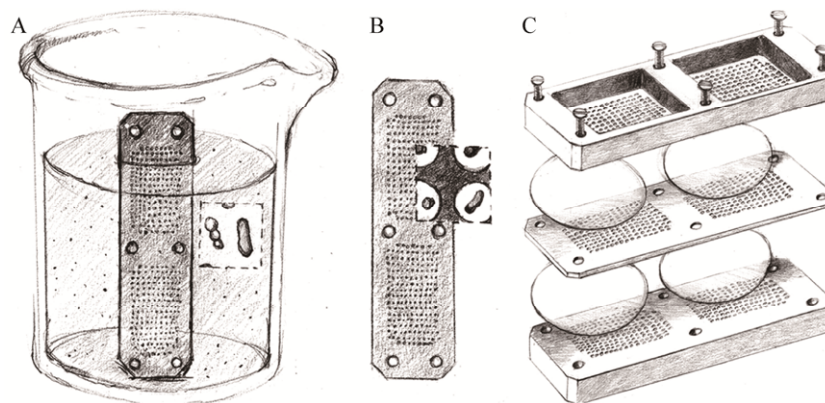


图 2 扩散生长盒原位培养环境微生物示意图<sup>[41]</sup>

Figure 2 Diffusion growth chamber for *in situ* cultivation of environmental microorganisms<sup>[41]</sup>

注: A: 扩散室是由两个 0.03  $\mu\text{m}$  的聚碳酸酯膜及夹在二者之间的垫圈组成的; B: 生长扩散室被培养在海洋沉积物的表面。

Note: A: The chamber is formed by a washer sandwiched between two 0.03  $\mu\text{m}$  pore-size polycarbonate membranes; B: Growth chambers incubated on the surface of marine sediment.

图3 分离芯片原位培养微生物的示意图<sup>[15]</sup>Figure 3 The schematic diagram isolation chip for high-throughput microbial cultivation *in situ*<sup>[15]</sup>

注: A: 将有多孔的中央平板浸到目标细胞悬液中进而捕获单细胞; 多孔中央平板的局部放大图; 分离芯片装配: 上下两边带有多孔的中央平板通过薄膜挤压中间的平板; B: 螺丝用来密封多孔内的细胞; C: 分离芯片装配: 上下两边带有多孔的中央平板通过薄膜挤压中间的平板, 螺丝用来密封多孔内的细胞。

Note: A: Dipping a plate with multiple through-holes into a suspension of mixed environmental cells leads to capturing (on average) a single cell; B: Detail with enlarged scale of multihole plate; C: I-chip assembly: upper and bottom plates with matching holes press the membranes against the central (loaded) plate. Screws provide sufficient pressure to seal the content of individual through-holes.

## 2.3 细胞捕获

**2.3.1 单细胞捕获分离:** 单细胞捕获分离技术是指利用拉曼光谱仪等设备对特征细胞进行分离, 进而对其功能进行研究。Wang 等通过优化光路、提高激光强度等方式显著提高了单细胞拉曼光谱的采集速度, 首次将微生物细胞拉曼图谱获取时间降低到毫秒级, 为高通量单细胞拉曼分选奠定了基础<sup>[47]</sup>。同时, 结合激光诱导向前转移(LIFT)原理, 发明了拉曼激活细胞弹射(Raman-activated cell ejection, RACE)技术, 可用于将特定拉曼表型的单细胞从复杂微生物群落中分离, 从而获取其基因组信息<sup>[47]</sup>。研究人员一直是通过利用如宏基因组学研究等方法来发现一些生物体, 探讨生活在环境中的微生物群体, 它们通常难以或不可能在实验室中进行培养。然而利用单细胞测序, 科学家将来自单个细胞的 DNA 扩增 10 亿倍, 破译了它的基因组, 从而为研究从前未知的“微生物暗物质”开辟了一条新途径。美国能源部下属联合基因组研究所的谭佳·沃克领导的研究团队选择了 201 种微生物和古生细菌的细胞, 并阅读了其部分基因组(从 10%到 90%不等, 取决于不同细胞)<sup>[16]</sup>。这些微生物来源于 9 种

不同的生存环境, 包括海底热水流火山口以及地下金矿等, 没有一种曾被测序或在实验室内培养过。研究人员通过选择高度多样化的微生物, 测定了部分的基因组序列(范围从低于 10%到高于 90%, 这取决于细胞), 来尝试探索这些暗物质(图 4)。通过序列阐明了这些微生物之间, 以及与其他物种之间的关系。在新数据的基础上, 作者提出了对古生菌域和细菌域的分类修正, 包括提议将古菌重新归入三个“超级门”<sup>[16]</sup>。通过应用单细胞捕获分离技术能够直接分离单细胞, 进而研究细菌多样性。

**2.3.2 荧光激活细胞分离技术:** 流式细胞术是一种荧光依赖的细胞表征技术, 也被广泛用来进行微生物细胞的分离。单个细胞在强光源(激光或激光二极管)前面通过时, 可以利用单个细胞的特性(如大小、形状、细胞荧光信号等)快速分析整个细胞群体。当把特异的荧光信号(如 FACS)与细胞分选结合起来后就可以对来自复杂环境样品的大量细胞进行快速分析, 如含有 FISH 探针的个体就能够从这个群体中被分拣出来。Ozawa 等利用流式细胞荧光分选技术(FACS)从水样中检测和分离低浓度的微生物, 有 31 种致病菌被分离出来<sup>[48]</sup>。Podar 等对不可培养

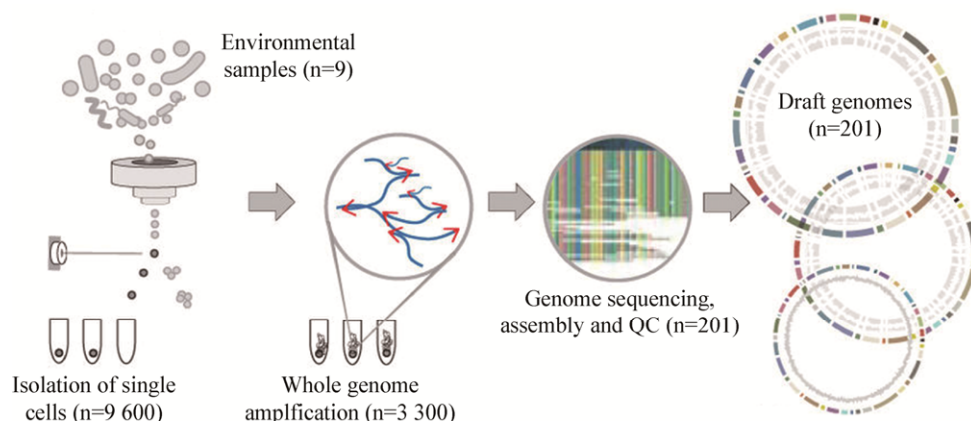


图 4 单细胞测序工作流程<sup>[16]</sup>

Figure 4 The schematic diagram of the single cell sequencing<sup>[16]</sup>

注: A: 每个细胞裂解后进行基因组扩增产生 3 300 个成功的扩增序列。大部分属于新谱系的单一扩增基因组被用于基因组测序和草图组装, 最终得到 201 个基因组草图。

Note: A: Each cell was lysed and the genome amplified yielding 3 300 successful amplifications. SAGs (single amplified genomes) belonging to major novel lineages were selected for genome sequencing and assembly resulting in 201 draft genomes.

的 TM7 生物门的细菌群体进行研究。他们利用原位荧光杂交技术和流式细胞术结合的方式对土壤样品中的单一细胞以及小批量细胞(5–100 个)进行分离, 接着对一些属于 TM7 门的细菌基因组片段进行扩增测序, 发现采用该方法可以从土壤群落中筛选到低频率(0.02%)的靶细胞, 表明该方法可以用来识别和分离群落中“无法看到的”稀有物种的代表性微生物<sup>[49]</sup>。

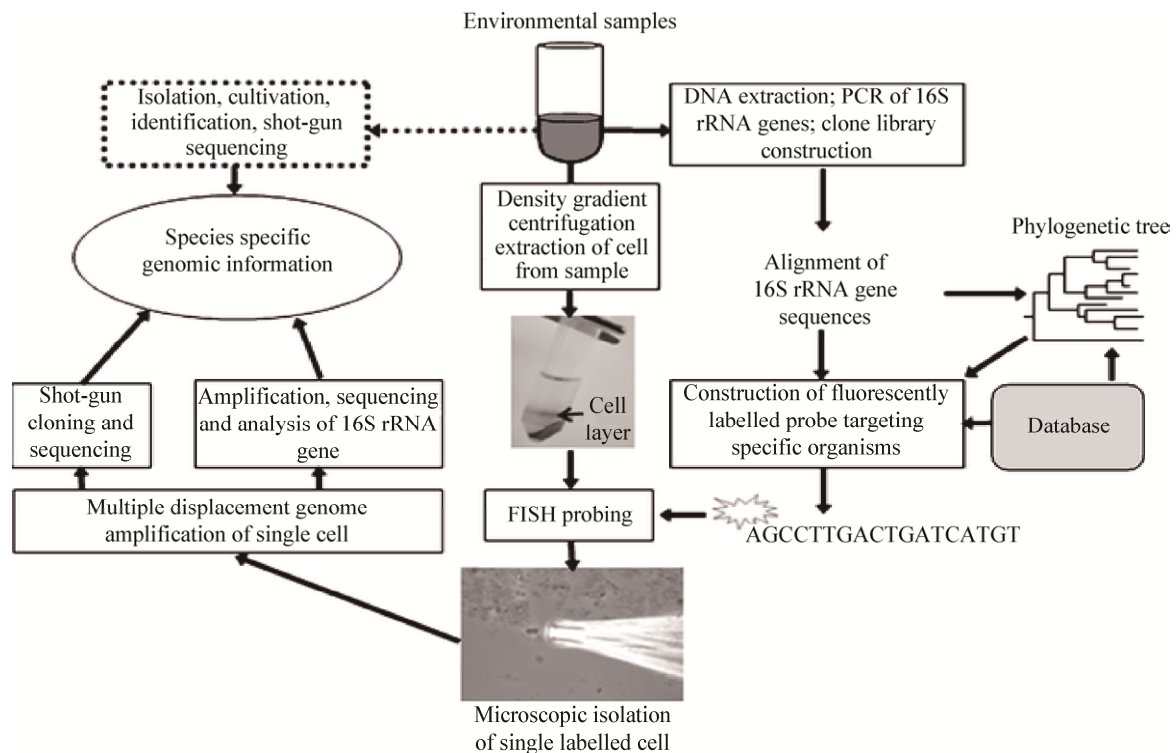
Kvist 等<sup>[17]</sup>从环境样本提取细胞后, 使用 Cy3 标记的探针进行荧光原位杂交。用显微操纵器将标记有明亮荧光信号的单细胞分离, 并用单个分离的细胞作为多重置换扩增的模板(图 5)。多重置换扩增的产物随后用于 16S rRNA 基因序列分析。结果显示>99% 16S rRNA 基因与土壤泉古菌 SCA1170 分支具有同源性。用此方法分离了一株土壤泉古菌。但是应用该方法有两个限制因素, 一是存在序列偏差, 尽管各种改进的策略正在逐步减少这些缺陷, 高覆盖率、高保真性及高特异性的扩增仍然是亟待解决的问题; 二是由于核糖体 RNA 很强的进化保守性, 从而导致以其为基础的系统发生分析的分辨率比较低, 如 16S rRNA 基因就无法完整地表征菌株(基因型)的特性。因此, 我们必须进一步改进这

种技术的操作过程, 以寻求更为有效的方法来减少非靶向生物体及外源 DNA 的污染等情况的发生。另外, 对测序得到的大数据的分析也是一个重大的挑战。

## 2.4 高通量分离培养

**2.4.1 培养组学:** 培养组学是一种通过增加培养条件来检测细菌多样性的高通量方法。首先利用血液培养基富集, 随后在琼脂培养基中进一步培养。在这一过程中, 确认了 3 种成分是必需的: 在血液培养瓶中预培养(分离到 56%的新菌种)、瘤胃液的添加(分离到 40%新菌种)以及羊血的添加(分离到 25%的新菌种)<sup>[50–53]</sup>。Lagier 等借助微生物培养组学(Culturomics), 综合多重培养条件、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)及 16S rRNA 基因测序技术, 极大地改善了培养条件, 增加了可培养微生物的数量<sup>[50]</sup>。同时, 选择最佳的培养条件来增加研究样本的数量和应用新的实验方法(新鲜样本的接种; 小菌落的检测和变形菌门、微需氧菌和嗜盐性的原核生物)来解决之前研究存在的不足<sup>[51–53]</sup>。通过这种方法, 鉴定出 1 057 个原核生物物种, 其中 531 种属于人体肠道菌群; 利用培养组学, 首次分离得到的肠道微生物种类至少增加了一倍<sup>[18]</sup>(图 6)。



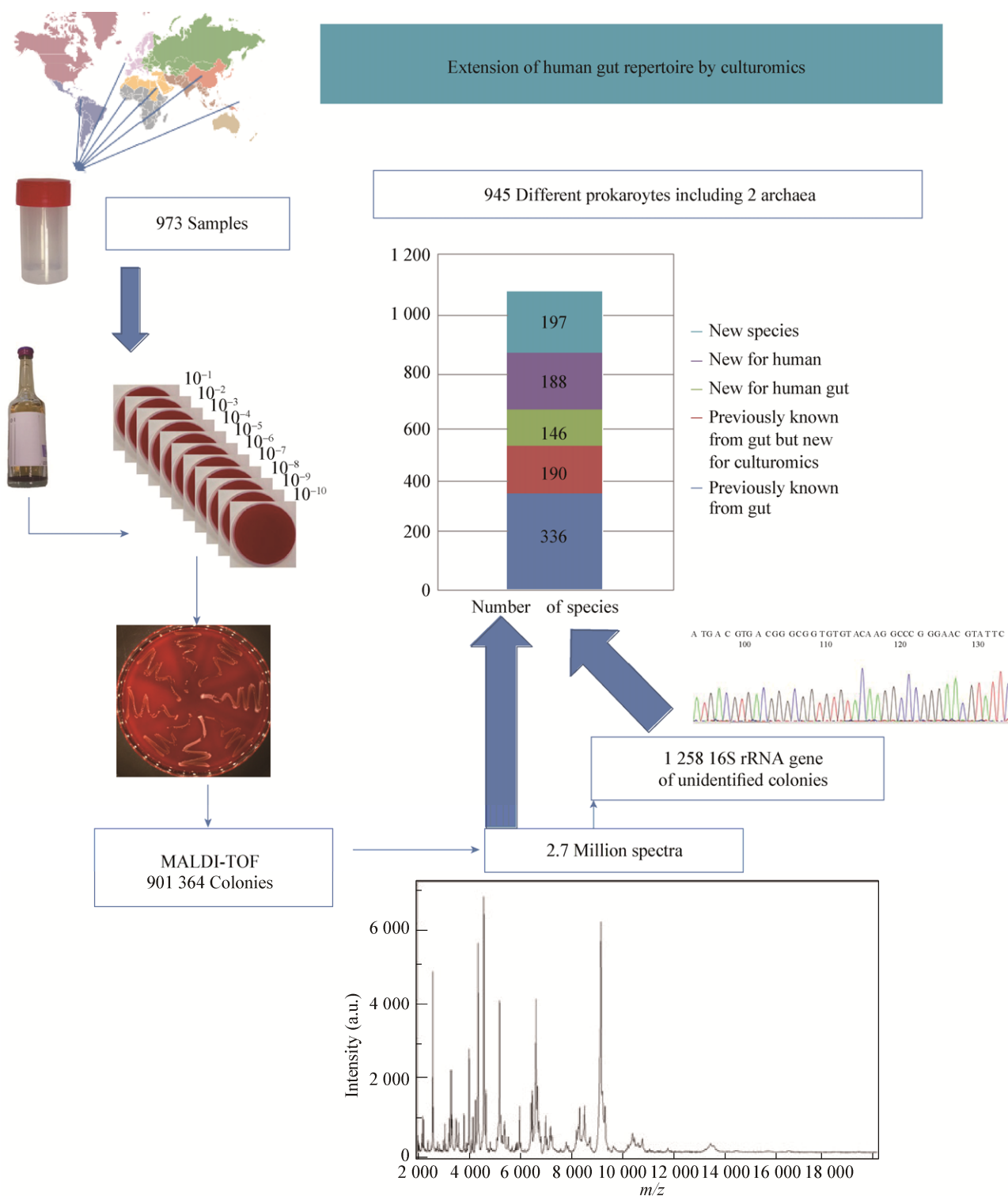
图5 利用荧光原位杂交进行单细胞分离和扩增的原理图<sup>[17]</sup>Figure 5 The schematic diagram of the single cell isolation and amplification procedure with fluorescent *in situ* hybridization probing<sup>[17]</sup>

注: A: 探测到特定的目标单细胞后被显微操纵器分离, 其基因组作为模板利用多重置换扩增技术用于基因组扩增。

Note: A: The specifically targeted single cell is probed and isolated using the micromanipulator, and the genome is used as template for genomic amplification using MDA.

**2.4.2 微液滴培养法:** Zengler 等<sup>[19]</sup>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(图 7)。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。这种方法可用于土壤和海水等环境, 并且能够在每个环境样本中分离得到 10 000 多个细菌和真菌<sup>[19]</sup>。Jiang 等借助微液滴平板划线技术研究微生物的多样性。从多环芳烃富集的土壤微生物群落中分离培养单细胞, 得到 4 个分枝杆菌分离株和 1 种之前未知的降解荧蒹的芽球菌属<sup>[54]</sup>。该方法与之前的微液滴方法相比, 不需要昂贵的自动化设备来产生微液滴, 并且操作简单易行。此外, 通过组合油相载体, 这个方法能够被应用到其他方

面, 例如将油脂、石油和能溶于油相的疏水性底物, 例如不溶于水的除草剂、杀虫剂和其他疏水环境污染物结合, 能够分离和识别具有生物修复和生物转化的环境微生物。美国东北大学的工程师 Edgar Goluch 和生物学家 Slava Epstein 开发出一种微型纳米设备, 用来从物种混合物中捕获单个细菌细胞, 产生这些细胞的纯培养可以解决微生物培养中的局限性<sup>[55]</sup>。这种新型设备可以使单一的细菌细胞通过通道进入到包含有细菌“食物”的小室中, 而细菌细胞进入的显微通道, 仅比细菌细胞稍窄一些。因此, 当进入一个细菌细胞后, 就可以阻断其余细胞的进入。在小室中细菌的细胞就可以开始增殖, 当其增殖到纯种样本并且充满整个箱体后, 研究者就会对其进行收集和鉴定。该设备的优势是养料室的收缩尺寸和营养成分可以动态调整, 进而增加捕获细胞的多样性, 或者优化特定性状物种的分离。

图6 培养组学工作的原理图<sup>[18]</sup>Figure 6 The schematic diagram of the culturomics work<sup>[18]</sup>

注：A：培养组学是一项综合多重培养条件、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)及 16S rRNA 基因测序技术。

Note: A: Culturomics combines multiple culture conditions and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight and 16S rRNA gene for identification.

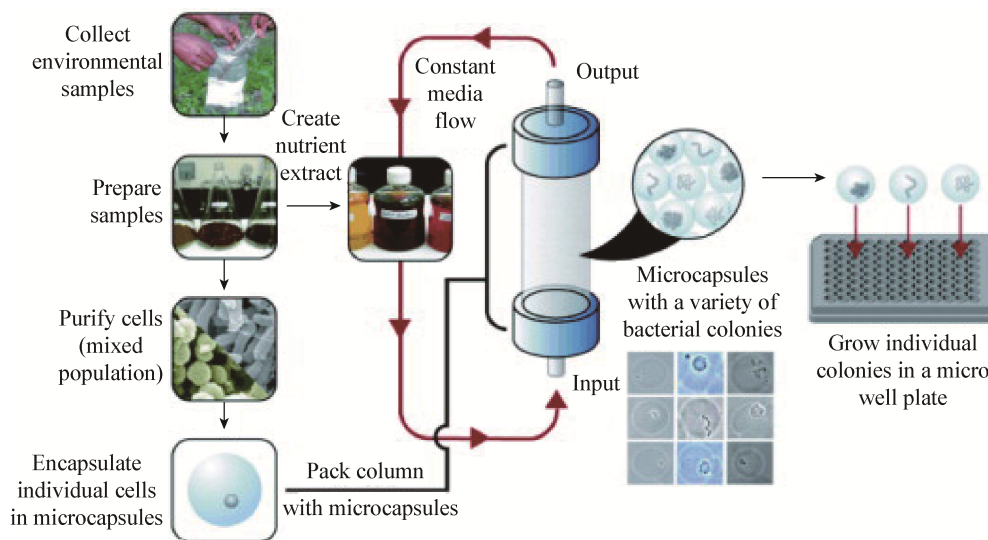


图 7 基于单细胞包埋在凝胶微滴板中的高通量培养方法流程图<sup>[19]</sup>

Figure 7 Flow diagram of high-throughput cultivation approach based on the encapsulation of single cells in microcapsules<sup>[19]</sup>

注: A: 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。  
Note: A: This technique uses microcapsules to encapsulate single cells combined with parallel microbial cultivation under low nutrient flux conditions. Flow cytometry is used as a sensitive tool to detect growth within the microcapsules.

**2.4.3 生物反应器培养法:** Amanullah 等采用目前一种新型的自动化小规模生物反应器, 通过构建适宜的 pH、溶解氧和葡萄糖的条件进行流加培养, 能够成功地模拟摇瓶和生物反应培养条件, 相较于传统方法可以实现更高浓度的活细胞培养, 浓度至少可达  $12 \times 10^6$  cells/mL<sup>[20]</sup>。为了能够从贫营养海洋生态系统中培养未培养微生物, Connon 等<sup>[56]</sup>利用高通量培养方法在低营养培养基中进行分离培养。研究人员使用将微量滴定板和新开发的细胞芯片相结合的方法, 检测限能达到  $10^3$  cells/mL。从近岸海水中收集的样本中, 至少 14% 的细胞利用这个方法能够被培养。与传统的微生物培养方法相比, 培养的数量要高 14~1 400 倍。在培养出的微生物中, 4 种独特的细胞谱系属于之前未培养的海洋厚壁菌门。这个方法在培养已知的海洋克隆文库中未培养的海洋浮游微生物是有效的<sup>[56]</sup>。

### 3 未培养微生物应用前景

未培养微生物在自然环境微生物群落中占有非常高的百分比(约 99%), 无论是其物种类群, 还

是新陈代谢途径、生理生化反应、产物等方面都存在着不同程度的新颖性和丰富的多样性, 因而其中势必蕴含着巨大的生物资源, 具有非常可观的应用前景。首先, 在生物降解方面, 厦门大学微生物研究所的实验室从在生态环境中寻找未培养微生物及其降解基因的角度出发, 应用宏基因组技术构建文库, 在寻找抑制赤潮藻类的相关基因及 PAHs 高效降解基因已进行了大量研究, 已取得初步研究成果, 期望在未培养微生物中寻找高效功能基因并应用于污染的生态环境治理。其次, 在药物筛选方面, Ouyang<sup>[57]</sup>利用琼脂糖凝胶包埋法从中国南海的多种海绵中分离得到超过 400 kb 大小的细菌 DNA 片段, 并用获得的大片段 DNA 构建了海绵 *Halichondria* sp. 的 BAC 文库。此外, 在酶类资源发掘方面, 多位科学家利用功能性筛选可以快速地从多个克隆子中鉴定出全长基因, 并由此获得这些功能基因的产物, 为工业、医药和农业提供一些新的天然活性物质如各种酶类及一些次生代谢产物等, 包括 4-羟基丁酸脱氢酶、N-酰基酪氨酸合成

酶、几丁质酶、淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、酯酶等。

#### 4 总结与展望

目前为止,因为单纯的基因测序无法解答微生物群落功能和代谢,因此,分离未培养微生物的方法越来越受微生物学者关注。然而,传统的方法存在分离效率低、操作复杂、设备昂贵或缺乏群体交互作用等缺点,难以分离特定功能微生物(群)。因此,本文综述了改良培养基、共培养、原位培养、单细胞捕获分离、荧光激活细胞分离技术、培养组学、微液滴培养法等新方法,并且提出必要时可几种培养手段相结合,优势互补,从多个角度对未培养微生物进行分离培养。同时,我们要发掘未培养微生物丰富的基因资源,发现新的酶类和化合物。基于以上研究现状,笔者认为,未来还应在以下几个方面加强研究:

(1) 笔者实验室从事瘤胃微生物分离培养研究工作多年,在厌氧滚管技术<sup>[58]</sup>和调整培养基<sup>[13]</sup>等方面均进行了很多探索,目前通过富集培养已成功从奶牛瘤胃中分离得到具有 TVA 氢化能力的微生物菌株一株;从瘤胃壁上分离得到地衣芽孢杆菌和奇异变形菌,从瘤胃液中分离获得白色瘤胃球菌、溶糊精琥珀酸弧菌和布氏密螺旋体,总共 5 种尿素分解菌,为进一步认识瘤胃微生物提供理论依据和方法基础。同时,我们实验室发明了一种基于短序列的引物设计来定量差异细菌的方法,并成功运用了基于短的 16S rRNA 基因序列设计的引物定量目标未培养细菌,结果发现与饲喂混合粗饲料的奶牛瘤胃微生物相比,饲喂秸秆粗饲料的奶牛瘤胃中显著减少的未培养细菌 R-UB 来源于 *Succinivibrionaceae*,有助于我们通过针对性地调控瘤胃微生物来更好地利用秸秆粗饲料资源<sup>[59]</sup>。此外,我们利用自主研发的人工瘤胃模拟系统,以尿素和脲酶抑制剂(乙酰氧肟酸)分别作为尿素分解菌的激活剂和抑制剂,通过高通量测序技术研究细菌 16S rRNA 基因变化,揭示瘤胃优势尿素分解菌群。最终揭示了瘤胃优势尿素分解菌: *Pseudomonas*、

*Streptococcus*、*Haemophilus*、*Bacillus*、*Neisseria*、*Actinomyces* 和 *Succinivibrionaceae*<sup>[60]</sup>。该研究解决了纯培养难题,这对于胃肠道重要功能菌群的鉴定提供了新的研究思路。另外,奶牛瘤胃尿素分解菌群的鉴定,为调控瘤胃尿素代谢和提高尿素氮利用率提供了新的调控靶标。但是一方面由于我们仍然缺乏对微生物的多样性、生存环境以及在生物进化中地位的认识,无法设计微生物生长的原位环境实现群体培养,导致依赖其他微生物的代谢活动或者其他环境条件中的微生物不能生长。另一方面,缓慢生长的或稀有的微生物经常在培养和测序的过程中被丰度相对高的微生物所掩盖。因此还需继续加强对微生物生理环境的分析研究,解析影响未培养微生物不能培养的关键营养因子。

(2) 虽然以共培养、原位培养、单细胞捕获分离、荧光激活细胞分离技术、培养组学、微液滴培养法等为代表的分离培养技术近年来迅速发展,但一些常规方法(如传统微生物培养法、厌氧滚管技术、改良培养基等)也不能完全摒弃。应该将多种技术相结合,为探究环境中微生物分布和多样性,解析不同环境条件下微生物生态功能,挖掘环境中未培养微生物,更新和完善微生物数据库等提供新的方法学支持。

(3) 必须全面理解微生物生理适应性与群体行为,发展和革新培养技术,改变微生物培养方式,设计尽可能接近微生物生活的自然环境,培养出更多的“不可培养微生物”,推动来源于未培养微生物的新基因、新活性物质和天然产物等资源的挖掘利用。

#### 参考文献

- [1] Socranksy SS, Gibbons RJ, Dale AC, et al. The microbiota of the gingival crevice area of man-I: total microscopic and viable counts and counts of specific organisms[J]. Archives of Oral Biology, 1963, 8(3): 275-280
- [2] Munson MA, Banerjee A, Watson TF, et al. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(7): 3023-3029
- [3] Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(18):



- 4765-4774
- [4] D'Onofrio A, Crawford JM, Stewart EJ, et al. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria[J]. *Chemistry & Biology*, 2010, 17(3): 254-264
  - [5] Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 309(1): 1-7
  - [6] Shleeva MO, Kudykina YK, Vostroknutova GN, et al. Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification[J]. *Tuberculosis*, 2011, 91(2): 146-154
  - [7] Tanaka T, Kawasaki K, Daimon S, et al. A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24): 7659-7666
  - [8] Mihai MM, Holban AM, Giurcaneanu C, et al. Microbial biofilms: impact on the pathogenesis of periodontitis, cystic fibrosis, chronic wounds and medical device-related infections[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2015, 15(16): 1552-1576
  - [9] Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, et al. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(6): E791-E800
  - [10] Davis JJ, Xia FF, Overbeek RA, et al. Genomes of the class *Erysipelotrichia* clarify the firmicute origin of the class *Mollicutes*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(7): 2727-2741
  - [11] Kantor RS, Wrighton KC, Handley KM, et al. Small genomes and sparse metabolisms of sediment-associated bacteria from four candidate phyla[J]. *mBio*, 2013, 4(5): e00708-e00713
  - [12] He XS, McLean JS, Edlund A, et al. Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(1): 244-249
  - [13] Li D, Wang JQ, Bu DP. Ruminal microbe of biohydrogenation of trans-vaccenic acid to stearic acid *in vitro*[J]. *BMC Research Notes*, 2012, 5: 97
  - [14] Park J, Kerner A, Burns MA, et al. Microdroplet-enabled highly parallel co-cultivation of microbial communities[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e17019
  - [15] 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
  - [16] Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 431-437
  - [17] Kvist T, Ahring BK, Lasken RS, et al. Specific single-cell isolation and genomic amplification of uncultured microorganisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(4): 926-935
  - [18] Lagier JC, Khelaifa S, Alou MT, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1: 16203
  - [19] Zengler K, Walcher M, Clark G, et al. High-throughput cultivation of microorganisms using microcapsules[J]. *Methods in Enzymology*, 2005, 397: 124-130
  - [20] Amanullah A, Otero JM, Mikola M, et al. Novel micro-bioreactor high throughput technology for cell culture process development: reproducibility and scalability assessment of fed-batch CHO cultures[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 106(1): 57-67
  - [21] Köpke B, Wilms R, Engelen B, et al. Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7819-7830
  - [22] Ryan RP, Dow JM. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria[J]. *Microbiology*, 2008, 154(7): 1845-1858
  - [23] Davis KER, Joseph SJ, Janssen PH. 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
  - [24] Giovannoni S, Stingl U. The importance of culturing bacterioplankton in the 'omics' age[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(10): 820-826
  - [25] Tripp HJ, Kitner JB, Schwalbach MS, et al. SAR11 marine bacteria require exogenous reduced sulphur for growth[J]. *Nature*, 2008, 452(7188): 741-744
  - [26] Sait M, Hugenholtz P, Janssen PH. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(11): 654-666
  - [27] Sharma R, Ranjan R, Kapardar RK, et al. 'Unculturable' bacterial diversity: an untapped resource[J]. *Current Science*, 2005, 89(1): 72-77
  - [28] Kashefi K, Holmes DE, Reysenbach AL, et al. Use of Fe(III) as an electron acceptor to recover previously uncultured hyperthermophiles: isolation and characterization of *Geothermobacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1735-1742
  - [29] Santini JM, Kappler U, Ward SA, et al. The NT-26 cytochrome *c<sub>552</sub>* and its role in arsenite oxidation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2007, 1767(2): 189-196
  - [30] Alain K, Querellou J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges[J]. *Extremophiles*, 2009, 13(4): 583-594
  - [31] Tyson GW, Banfield JF. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective[J]. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(9): 411-415
  - [32] Kim J. Review and future development of new culture methods for unculturable soil bacteria[J]. *The Korean Journal of Microbiology*, 2011, 47(3): 179-187
  - [33] Janssen 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
  - [34] Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, et al. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 2445-2450

- 4748-4755
- [35] Kawanishi T, Shiraishi T, Okano Y, et al. New detection systems of bacteria using highly selective media designed by SMART: selective medium-design algorithm restricted by two constraints[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16512
- [36] Kamagata Y, Tamaki H. Cultivation of uncultured fastidious microbes[J]. Microbes and Environments, 2005, 20(2): 85-91
- [37] Nadell CD, Xavier JB, Foster KR. The sociobiology of biofilms[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(1): 206-224
- [38] Crocetti GR, Banfield JF, Keller J, et al. Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes[J]. Microbiology, 2002, 148(11): 3353-3364
- [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] Evstigneeva A, Raoult D, Karpachevskiy L, et al. Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and *Streptococcus pneumoniae*[J]. Microbiology, 2009, 155(2): 657-664
- [41] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. Science, 2002, 296(5570): 1127-1129
- [42] Pörtner R, Märkl H. Dialysis cultures[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50(4): 403-414
- [43] Ferrari BC, Binnerup SJ, Gillings M. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8714-8720
- [44] 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
- [45] 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
- [46] Jung D, Seo EY, Epstein SS, et al. Application of a new cultivation technology, I-tip, for studying microbial diversity in freshwater sponges of Lake Baikal, Russia[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 90(2): 417-423
- [47] Wang Y, Ji YT, Wharfe ES, et al. Raman activated cell ejection for isolation of single cells[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(22): 10697-10701
- [48] Ozawa S, Okabe S, Ishii S. Specific single-cell isolation of *Escherichia coli* O157 from environmental water samples by using flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2016, 13(8): 456-461
- [49] Podar M, Abulencia CB, Walcher M, et al. Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(10): 3205-3214
- [50] Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, et al. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 28(1): 237-264
- [51] Pfleiderer A, Lagier JC, Armougom F, et al. Culturomics identified 11 new bacterial species from a single anorexia nervosa stool sample[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2013, 32(11): 1471-1481
- [52] Lagier JC, Armougom F, Million M, et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2012, 18(12): 1185-1193
- [53] Dubourg G, Lagier JC, Robert C, et al. Culturomics and pyrosequencing evidence of the reduction in gut microbiota diversity in patients with broad-spectrum antibiotics[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2014, 44(2): 117-124
- [54] Jiang CY, Dong LB, Zhao JK, et al. High-throughput single-cell cultivation on microfluidic streak plates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(7): 2210-2218
- [55] Tandogan N, Abadian PN, Epstein S, et al. Isolation of microorganisms using sub-micrometer constrictions[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e101429
- [56] Cannon 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
- [57] Ouyang YC, Dai SK, Xie LW, et al. Isolation of high molecular weight DNA from marine sponge bacteria for BAC library construction[J]. Marine Biotechnology, 2010, 12(3): 318-325
- [58] Zhao S, Zhao J, Bu D, et al. Metabolomics analysis reveals large effect of roughage types on rumen microbial metabolic profile in dairy cows[J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 59(1): 79-85
- [59] Jin D, Zhao SG, Zhang YD, et al. Diversity shifts of rumen bacteria induced by dietary forages in dairy cows and quantification of the changed bacteria using a new primer design strategy[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(11): 2596-2603
- [60] Jin D, Zhao SG, Wang PP, et al. Insights into abundant rumen ureolytic bacterial community using rumen simulation system[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1006