

未培养微生物资源*

崔晓龙** 徐丽华** 文孟良 李铭刚
李一青 李文均 彭 谦 姜成林

(云南大学省微生物研究所教育部微生物资源重点实验室 昆明 650091)

摘要: 简要介绍未培养微生物的概念、多样性、研究的理论基础和方法, 并就未培养微生物资源的存在形式、开发利用途径和应用前景进行了讨论。

未培养微生物 (as yet uncultured microorganisms) 是指迄今所采用的微生物纯培养分离、培养方法还未获得纯培养的微生物。顾名思义, 未培养微生物资源 (uncultured microbial resources) 既是蕴藏于这类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。由于这类微生物在自然环境微生物群落中占有非常高的百分比 (约为 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, 因而其中势必蕴涵着巨大的生物资源。所以, 对各种自然环境微生物, 尤其是对未培养微生物进行广泛深入的研究, 不仅是微生物学基础理论研究的需要, 也是未培养微生物资源开发利用的基础。

1 未培养微生物

自从科赫 (Robert Koch) 于 1881 年在其论文^[1]中介绍固体培养基及将混合培养物进行纯化的纯培养技术以来, 人们采用各种纯培养方法从自然环境中分离得到众多微生物的纯培养。然而人们同时也发现, 在显微镜下可以观察到的绝大部分自然环境微生物, 很难或不能通过传统纯培养分离方法得到其纯培养。于是对这类微生物进行了广泛深入的研究, 并于 1982 年提出了“不可培养 (活) 微生物” (viable but nonculturable microorganisms, VBNC microorganisms) 的概念^[2]。Stackebrandt 等将那些利用分子生物学技术能够检测到, 但还不能获得纯培养的微生物定义为“ (至今) 未培养微生物” (as yet uncultured microorganisms)^[3]。前一定义包括那些可获得纯培养, 但在环境因子的胁迫下不能生长、处于休眠状态下的微生物。

2 未培养微生物的多样性

未培养微生物广泛存在于各种自然环境中, 特别是各种极端环境中, 即其生态系统、物种、遗传 3 个水平上都表现出极其丰富的多样性。以细菌为例, 目前在细菌域 (domain) 中约有 52 个门 (phylum), 其中 12 个门为 Woese 等 1987 年描述的^[4], 另外 14 个门为 1987 年之后发现的, 并已获得各自代表微生物的纯培养, 而余下的 26 个门则因为迄今尚未得到其各

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30260004, 30460004, 30270004)

Projects granted by the National Natural Science Foundation of China (NSFC)

科技部基础研究重大项目前期研究专项 (No. 2001CCC00600)

** 通讯作者 Tel: 0871-5034621, Fax: 0871-5173878, E-mail: xlcuiynu@yahoo.com.cn, lihxu@ynu.edu.cn

自代表微生物的纯培养,故称为“后选门”(candidate phylum),只是其在系统发育分析中介于《伯杰氏细菌系统学手册》^[5]中门的可培养代表微生物。可纯培养的26个门的代表菌由于其类群数量有限,也并不能完美地代表这26个门,且包含许多未培养微生物^[6]。

3 未培养微生物研究的基础理论

Zucherandl and Pauling 于1965年提出生物大分子能够反映生物的进化历史^[7],从而奠定了分子系统学的基础。20世纪80年代,Pace等^[8]研究人员开始应用Woese等^[9]的可培养微生物分子进化与分子系统发育(molecular phylogeny)理论与分子生物学技术,即利用核糖体小亚基rRNA(small subunit ribosomal RNA,SSU rRNA),尤其是16S rRNA分子,揭示生物进化与系统发育关系的理论及分子生物学技术研究自然环境的微生物多样性,亦即可以直接通过获取rRNA或rRNA基因序列信息对微生物进行鉴定,而无须分离获得纯培养,而且可以利用类群探针(group-specific probe)对自然环境微生物进行鉴定和量化分析^[10],但必须依赖于可培养微生物的序列数据。随着分子生物学技术的发展,尤其是PCR仪的发明和DNA自动测序仪的出现,对未培养微生物的研究,得到广泛深入地开展,发现了众多新的未培养微生物类群。尽管这些微生物在各种自然生态系统中发挥着重要的作用,然而这些微生物各自在自然微生物群落或生态系统中的生理代谢、作用、功能几乎完全未知。新兴的基因组学(genomics)和蛋白质组学(proteomics)方法与技术则既能让人们认识微生物的系统发育关系,同时也能了解生理代谢功能,尤其是微生物群落的生态系统功能。

4 未培养微生物多样性的研究方法

应用于未培养微生物多样性研究的分子生物学方法与技术,大致可以分成两大类,即全程rRNA分析法(full-cycle rRNA analysis, including two phases: sequencing and probing)^[10]和指纹分析法(fingerprinting)。相关技术有FISH、FCM(flow cytometry)和CLSM(confocal laser scanning microscopy)等,都需要荧光标记的特异探针,往往是全程rRNA分析法的一部分。这两类方法并无严格的界限,如DGGE形成的DNA带也往往被切下、测序并进行系统发育分析,而不是单纯的指纹分析。指纹分析法又包括群落DNA指纹分析(如DGGE、ARDRA、T-RFLP)和群落生理生化指纹分析(如BIOLOG、PLFA、FAMEs分析)。此外,还有较早用于群落动态研究的群落基因组DNA复性分析法(DNA re-association)。目前,这些方法与技术,结合基因组学、蛋白质组学的方法与技术,如功能基因分析、酶活性测定等,不仅可以开展自然环境未培养微生物群落的多样性及其群落结构的研究,而且能够揭示自然生态系统的结构、功能及其相互关系,即可以直接通过基因组序列及基因产物,分析或预测未培养微生物的系统发育关系、生理生化反应及其代谢途径等,而无须首先获得纯培养^[11,12]。

5 未培养微生物资源的研究、开发利用的可能途径

通常,利用传统纯培养法(包括各种物理分离法,如显微操作、密度梯度离心等),结合分子生态学方法与技术对自然环境微生物进行分析,了解未培养微生物的系统发育关系和基本的生理反应(如BIOLOG、API结果),然后依据其系统发育关系相近的可纯培养微生物的生理代谢特征和其生存的自然环境条件,设计培养基和培养条件,最终获得纯培养。

但是,随着微生物基因组时代(microbial genomic era)的到来,人们开始构建微生物群落的集群基因组(collective genomes),并对其进行测序,得到各组成微生物的基因组序列,结合蛋白质组学的研究结果,采用比较基因组学(comparative genomics)的方法鉴定存在于各物种的所有基因。这使得人们可以详细了解未培养微生物新的代谢途径、基因表达的调控机制、

找到病原、抗性基因,以及发现新的基因等。这些信息不仅可以使人们认识基因、物种进化的过程、未培养物种的组成及其系统发育关系,而且可以了解其生态学功能、确定其生态位,为准确设计培养基和培养条件,以及最终获得纯培养奠定了基础。这些都为未培养微生物(包括可培养微生物)的开发利用开辟了极为广阔前景。因此,暂时不能获得纯培养的未培养微生物,则利用BAC等载体直接构建群落基因组文库(metagenome library),通过比较分析,同时获得各基因组的系统发育、主要功能基因和酶活性的数据,然后再设计培养基和培养条件,尝试分离纯化。

一旦获得微生物的纯培养,则采用可培养资源微生物相同或相似的途径进行开发利用。

由于共生等原因而不能纯培养的微生物,可考虑直接依据基因或基因组、蛋白质序列,以及其调节表达机制构建高效表达的工程细胞等途径加于开发利用。

6 未培养微生物资源的存在形式与开发利用前景

未培养微生物资源如同可培养微生物资源类似,主要存在形式与应用前景有:

- ①基因,尤其是编码功能蛋白、酶(如*Taq*酶等高温稳定酶)的基因;
- ②代谢产物,如具有生物活性的次生代谢产物,尤其是各类先导化合物(lead compound);
- ③特殊代谢途径,如合成或分解、利用某些特殊化合物的新代谢途径,用于生物降解等;
- ④新的代谢调控机理,如用于筛选或构建高产或高活性菌;
- ⑤具有不同生态功能的微生物活细胞等,如生物膜用于污水处理,污染或破坏的微生物生态系统的恢复;
- ⑥人工构建的、可用于科研与生产的细胞。

由于未培养微生物无论是其物种类群,还是新陈代谢途径、生理生化反应、产物等都存在着丰富的新颖性和多样性,因而比以往的可培养微生物具有更为丰富和多样化的可供人类开发利用的生物资源。同时,基因组学、蛋白质组学的理论、方法与技术的发展,尤其是环境基因组学(Environmental genomics或metagenomics)的发展,必将在未培养微生物资源的开发利用中发挥越来越重要的作用。

参考文献

- [1] Koch R. Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. 1881, Mitth. a. d. Kaiserl.
- [2] Xu H-S, Roberts N C, Singleton F I, et al. *Microbiology and Ecology*, 1982, **8**: 313 ~ 323.
- [3] Stackebrandt E, Embley T M. Diversity of uncultured microorganisms in the environment. In: *Nonculturable Microorganisms in the Environment*, ed. R. R. Colwell and D. J. Grimes. Washington, D. C.: ASM Press, 2000, 57 ~ 75.
- [4] Woese C R. *Microbiol Rev.*, 1987, **51**: 221 ~ 271.
- [5] Boone D R, Castenholz R W, Garrity G M, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. New York: Springer, 2001.
- [6] Rapp M S, Giovannoni S J. *Annu Rev Microbiol*, 2003, **57**: 369 ~ 394.
- [7] Zuckerkandl E, Pauling L. *J Theor Biol*, 1965, **8**: 357 ~ 366.
- [8] Olsen G J, Lane D L, Giovannoni S J, et al. *Annu Rev Microbiol*, 1986, **40**: 337 ~ 365.
- [9] Woese C R, Fox G. E. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**: 5088 ~ 5090.
- [10] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. *Microbiol Rev* 1995, **59**: 143 ~ 169.
- [11] B J O, Suzuki M T, Koonin E V., *Environ Microbiol*, 2000, **2**: 516 ~ 529.
- [12] Delong E. *Current Opinon in Microbiology*, 2002, **5**: 520 ~ 524.