

从环境中分离培养微生物：培养基营养水平至关重要

周楠 姜成英 刘双江*

(中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要：根据目前的微生物学知识体系，利用现有的微生物培养技术仅仅能够分离和培养部分微生物，自然环境中绝大多数微生物暂不能培养。本文总结归纳了部分微生物培养技术和培养策略，包括采取生境隔离、延长培养时间以及模拟自然环境条件等方法，尤其是培养基的营养水平对可培养微生物数量及种类产生重要影响。简要总结了寡营养微生物及其生态意义，以及营养物浓度影响微生物生长的机理。提出可根据微生物的生态环境条件及细胞生理特性，设计合理的培养条件和培养方法，以及采用多种分离培养方法联合，以期最终提高环境微生物的可培养性。

关键词：未培养微生物，分离培养技术，稀释培养，寡营养，培养基

Cultivation of microorganisms from environments: nutrient level of the culture medium is of great importance

ZHOU Nan JIANG Cheng-Ying LIU Shuang-Jiang*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Concerning the present microbiological knowledge system, we can only isolate and culture a small fraction of microbes with the existing microbial culture techniques, leaving the vast majority of microorganisms in the natural environment unculturable. This article summarizes some microbial cultivation techniques and strategies, including space separation, prolongation of cultivation, and simulation of the natural environmental conditions. Much attention is paid to the effects of the medium nutrient levels on microbial culturability. This article also briefly summarizes the physiology and ecology of oligotrophic bacteria, as well as how nutrient concentration affects microbial growth. It is proposed that microbial culturability would be improved via rational design of culture medium and applying proper culture conditions.

Keywords: Uncultured microorganisms, Isolation and cultivation techniques, Diluted cultivation, Oligotrophic, Culture medium

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31230003, 21377161)

***Corresponding author:** Tel: 86-10-64807423; Fax: 86-10-64807421; E-mail: liusj@im.ac.cn

Received: January 06, 2016; **Accepted:** March 14, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 14, 2016
基金项目：国家自然科学基金项目(No. 31230003, 21377161)

***通讯作者:** Tel: 86-10-64807423; Fax: 86-10-64807421; E-mail: liusj@im.ac.cn

收稿日期：2016-01-06；接受日期：2016-03-14；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2016-03-14

研究和认知环境中微生物的功能,特别是开发和利用这些微生物服务环境保护和人类可持续发展,离不开微生物分离培养技术。微生物的分离培养是指通过一定的技术方法,将环境(样品)中微生物区系的物种成员(菌株)分离出来,并在实验室可控条件下,能够重复培养/繁殖该种微生物细胞,获得与初始性状相同的后代。现有微生物分子生态学研究表明,自然界中绝大多数微生物物种细胞尚不能被现有的微生物培养方法和技术进行复苏、分离和培养^[1-2],这些微生物被称为未培养微生物(Uncultured microorganisms)。例如,采用经典微生物培养技术,即营养琼脂平皿培养技术,海水中仅有约为0.001%–0.1%、淡水中约为0.25%、土壤中约为0.3%的微生物细胞可以生长,最终形成菌落^[3],这些样品中有99.9%以上的微生物细胞不能生长,它们代表着环境中的未培养微生物。研究和认识这些微生物的生物学特性和生态学功能,以及分离和培养这些未培养微生物,是当今微生物学的优先发展领域和重要任务,其所面临的主要挑战是了解微生物为什么没有被培养,以及影响微生物可培养性的因素。

影响微生物可培养性的因素众多,自然生境下微生物细胞的生理状态、营养需求与生态系统中其它生物和非生物因子的相互作用等,均制约着微生物细胞是否能够在人为控制条件下生长和繁殖。如今,人们对一些物理、化学环境因子,包括对普通生命是极端条件的高温、低温、高酸、高盐等对微生物生长的影响已经有了比较深刻和全面的认识,并且利用这些知识获得了许多极端微生物资源,例如广泛分布于热泉、地热区、火山口及深海热液喷口等高温环境中的嗜热菌^[4]、南北极、冰山及冻土地区的嗜冷菌^[5]、酸性矿水等酸性环境中嗜酸菌^[6]、盐碱地及碱湖中的嗜碱菌^[7]和嗜盐微生物^[8]。除了这些物理、化学因子之外,还有一些环境条件客观上普遍存在但常常被忽视,例如培养环境的压力、气体组成、微生物细胞间的相互作用等,已知从深海等高压环境中分离到的嗜压微生物^[9]在

常压下不能生存,微好氧微生物只能在较低的氧分压条件下生长。

微生物细胞例如大肠杆菌细胞在环境中有一种存在状态,被称为“活的非可培养”(Viable but non-culture, VBNC)状态^[10],通常指细菌处于不适于生长的环境中,细胞形态发生改变,虽然具有代谢活性,但用常规培养方法不能使其生长繁殖。这是与未培养微生物的概念相关、但却完全不同的另外一个概念。目前已经知道,VBNC细胞可以被一些特殊分子物质激活,转化为可以繁殖的细胞。最新的研究发现,还有些微生物细胞在培养基上形成的菌落很小,需要借助显微镜等工具才可观察到,它们通常是一些寡营养微生物细胞或者生长缓慢的微生物细胞组成的小型聚集体,如今我们称之为微菌落(Microcolony)^[11],这些微生物常常是我们以前没有发现而称之为未培养微生物的一部分。本文归纳总结现有的一些微生物分离培养技术,讨论经典培养基和培养方法导致微生物可培养性低的原因,提出改进微生物培养的一些方法和具体培养措施。

1 环境微生物的培养策略

1.1 培养基的发明

培养基(Culture medium)是人工配制的,具有满足微生物生长的营养成分,适合微生物生长的基质,可以是液态或者固态。配制培养基常用的营养成分包括:蛋白胨、牛肉浸膏、酵母粉等,琼脂是制备固体培养基最为常用的凝固剂。微生物学的鼻祖——巴斯德(L. Pasteur, 1822–1895)用肉汤做培养基^[12],证明了微生物可以培养(虽然他实验的最初目的是否定“自然发生学说”),这种“肉汤”可算是世界上第一个被人类利用的天然培养基。继巴斯德之后,德国著名细菌学家科赫(R. Koch, 1843–1910)成功地制备了固体培养基,并发明了培养皿,形成了平板(皿)分离培养技术。平板培养技术被广泛用于从各种环境样品和人体样品(病变组织、分泌物等)分离和培养各种微生物,并研究分离培养微生物的

特性和功能等,极大推动了细菌学和微生物培养技术的发展。从19世纪末到20世纪中期,在巴斯德、科赫及以后的拜杰林克(M. W. Beijerinck, 1851–1931)等学者的努力下^[12],培养基种类日益增多,除了牛肉膏蛋白胨培养基和营养琼脂培养基外,为了分离某些特殊类群细菌还在培养基中加入糖、血液、血清等物质,从此形成了基础培养基、糖发酵培养基、血培养基、富集培养基、分离培养基等。培养基种类的增加,体现了对微生物生理学特性认识的加深;同时,微生物生理学知识的积累和丰富又促进设计和发展新的微生物分离培养技术和方法。可以说没有培养基的发明和培养技术的发展,就没有现代微生物学。

1.2 培养基和培养皿的局限性

早在1898年,奥地利微生物学家H. Winterberg便发现了样品中微生物细胞的数量与培养基上形成的菌落数量并不相符^[13],1985年Staley和Konopka^[14]提出“伟大的平皿,计数太偏”(Great plate count anomaly),描述了平板培养菌落计数与自然环境中微生物实际数量之间存在显著差异的现象。我们知道,每种微生物对营养物质的需求是不同的,环境样品中含有大量的微生物细胞,没有一种培养条件能够满足环境中所有微生物细胞生长的需求。除此之外,生长速度快的细胞抑制生长慢的细胞生长,有些细胞只能形成微菌落或者需要与其它细胞的相互作用等,也会导致有些细胞不能在培养皿上形成菌落,或者菌落太小不能被观察到。因此,采用平板菌落计数会出现误差也就容易理解。

在固体培养基中同时接种不同生长速率的微生物,被观察到的总是那些菌落大而生长迅速的微生物。如果用生态学的理论来分析,快速生长的微生物是环境中的“R选择”者^[15],能对它们所遇到的生境中因时间和空间异质性而形成的高营养区域进行反应,短时间内迅速倍增。而环境中占多数的“K选择”者,能对有限资源进行最有效的竞争利用,保持极低的生长率,从而适应生境中的低营养条件。利用经典的、营养物质浓度较高的培养基可能对

“R选择”者进行有效富集,然而获得的却不一定是生境中密度最高、或者发挥主要功能的微生物。

1.3 对微生物采取生境隔离的培养策略

1993年,Button等^[16]和Schut等^[17]根据海洋环境寡营养的特点,开发了稀释培养法,并用于研究Resurrection Bay及荷兰North Sea中海水样品的微生物多样性。Button等将海水样品进行高度稀释,使最后稀释度的样品中仅含有极少数的、直至仅有一个微生物细胞,从而减少了微生物之间的相互干扰,因而被培养的可能性会大大提高。采用过滤灭菌的海水将样品稀释至每管仅有少量细胞(1–100个),以同样来源的灭菌海水作为培养基质,采用流式细胞仪计数发现多个样品中微生物细胞浓度可以达到 10^4 个/mL以上,并从中得到多个纯培养物^[16]。Schut等以同样方法从样品中获得37株寡营养细菌(Oligotrophic bacteria),其中15株仅能在低浓度营养物的培养基上存活,且其菌落微小,表现为专性寡营养型。他们对荷兰North Sea海域中微生物多样性的研究表明,该海域中兼性寡营养细菌和富营养菌所占比例低于1%,而超过半数微生物表型为专性寡营养,并从中分离到一株典型的海洋微型浮游细菌*Sphingomonas alaskensis*^[17]。

2001年,Franklin等^[18]对一个污水微生物群落从原液到 10^{-6} 梯度稀释后接种至R2A及SM培养基培养,重建每个稀释度得到的菌群后发现每一个稀释梯度都会多分离到2–3个独特的类群。Kenters等^[19]将羊胃中的微生物稀释至极限梯度(10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12})后接种于一种含有羊胃内容物的培养基上培养,发现1000个接种试管中有139个有微生物生长,其中54个为纯培养,与已知微生物的16S rRNA基因序列比对后,大部分相似度低于94%,并证实其中27株分属14个潜在的新属。

Connon等^[20]同样采用了稀释培养的方法分离得到一批之前未被培养的海洋微生物类群。该方法采用荧光显微镜计数样品中的细胞数,加入培养基稀释样品至每毫升1–5个细胞后置于48孔板内培养,在适当的生境内培养一段时间后每孔取适量培

养液过滤镜检,将检出有菌生长的培养物移至新鲜培养基中,同时进行PCR测序鉴定。该方法可高通量地分离环境样品中的细菌,避免了菌体之间相互影响。

Zengler 等^[21]采用琼脂糖微球包埋技术建立了一种更高通量的细菌分离纯化方法。该方法采用低熔点琼脂糖微球包埋已充分稀释的细菌,并置于培养柱中,通入恒定的低营养成分的培养液循环培养。待微球中包埋的细菌长到一定程度后,采用流式细胞仪分选带菌的微球至96孔板中进一步富集培养及鉴定。该方法避免了细菌在空间上的相互干扰,部分保留了细菌细胞间的物质和信息交流。

1.4 培养时间

Leadbetter^[22]发现,对于生长缓慢的微生物,比如倍增时间为48 h的微生物,需要5周时间才从单一细胞成长为一个肉眼可见的菌落。Hattori 等^[23]在其研究中也记录了土壤中各种细菌在固体培养基上出现菌落的速率。Button 等^[16]建立了稀释培养法的同时,在超过9周的时间内,让细菌在海水培养基中增值至可被检测的水平(超过 10^4 个/mL)。Janssen 等^[24]验证了延长培养时间这种简单的策略可以用以培养土壤中未培养微生物,得到多株酸杆菌门和疣微菌门的新种。

1.5 控制培养基的营养水平,模拟自然培养

一些研究者认为,采用经典培养基培养寡营养环境的样品,需要特别注意培养基的有机营养组分的浓度^[25]。研究者们将经典培养基稀释至不同营养水平培养环境样品,计数在不同浓度有机营养组分中寡营养微生物的数量^[26-30]。结果显示,营养丰富的培养基中微生物的数量并非最多,相反培养基中高浓度的营养物会抑制一些微生物细胞生长。用于培养寡营养环境中微生物的培养基中有机碳水平不应高于50 mg/L^[26-30],甚至可以采用模拟自然环境或将培养体系置于原生态的寡营养环境中培养富集环境微生物。Jung 等^[31]开发了一种称为I-tip的原位培养装置用来培养贝尔加海绵中的微生物。该装置采用Eppendorf的黄枪头作为器件的基本单

元,枪头尖端灌入酸洗的玻璃珠(粒径60–220 μm)用于阻止水体中较大体积的原生动物侵入却不影响细菌进入,在尖端后部注入含0.7%琼脂的R2A培养基后,将枪头末端的开口用灭菌的3M防水胶封闭。将枪头尖端插入海绵上培养4周后,将装置中富集的细菌用平板再分离培养,共得到了5个门共34种细菌,相较于直接用平板培养法得到的3个门16种微生物,I-tip法获得的微生物种群显然更接近原位样品焦磷酸测序的结果。Kaeberlein 等^[2]设计了由两层孔径为0.03 μm 聚碳酸酯膜包裹的扩散生长盒(Diffusion growth chamber),在其中接种了一些无法在普通培养基上生长的未培养细菌,扩散盒的独特结构避免了接种在其中的细胞逃逸,又允许盒中的细胞能与外界进行营养物和活性物质的交换。将这个能与外界进行物质交换的扩散盒放置于沙池并用海水覆盖培养,原先呈现未培养状态的细菌可以在膜上形成菌落,并从中分离到两株原先认为是不可培养的微生物。这一发现或许可以解释自然环境中大部分微生物无法被培养的原因,其生长可能需要外界一些环境因子或者其他菌株的帮助。

2 稀释培养基能培养更多的环境微生物

将常规的培养基进行稀释,能显著提高微生物的可培养率。Janssen 等^[24]采用最大似然值法(Most probable number)比较了澳大利亚牧场土壤中微生物在稀释100倍的肉汤培养基(DNM)和普通肉汤培养基中的生长效果,证明稀释的培养基上可以得到更多的微生物。Cho 等^[32]使用寡营养培养基在太平洋海岸及远洋样品中得到44株Gamma变形菌,这些细菌从海水初次接种到琼脂培养基时均无法形成菌落,但12株中有7株最终能在1/10 R2A琼脂糖培养基上形成菌落,但始终无法在富营养培养基中存活(有机碳浓度 >351 mg/L),因此命名该类细菌为寡营养海洋 γ -变形菌(Oligotrophic marine Gammaproteobacteria)。稀释培养基同样能从湖泊沉积物中分离获得大量的微生物,戴欣等^[33]研究我国

太湖水环境富营养化的过程中, 比较了太湖沉积物中的细菌在普通牛肉汁培养基和 10 倍稀释的牛肉汁培养基上的生长效果, 发现在稀释培养基上的菌落数量是富营养的牛肉汁蛋白胨琼脂培养基上菌落数量的 3–5 倍。研究结果还表明同时采用经典培养基和稀释培养基有助于从沉积物中分离到更多种微生物。

另外, 可将原生态位中的细胞置于低养分通量的培养基中进行长时间的驯化, 在适当的条件下令这些细胞复苏, 从而最终获得可培养的微生物细胞^[34]。Gasol 等^[35]采用逐步提高营养基质浓度驯化寡营养环境中的微生物, 获得 65 株细菌的纯培养物, 而直接采用较高营养水平的培养基却不能获得类似细菌, 该方法提供了一种从寡营养环境中分离新菌种的可能。

3 寡营养微生物/贫营养微生物

寡营养微生物又称贫营养微生物, 是指生存在有机质匮乏的极端生境中(深海、淡水、贫瘠土壤)的一类细菌, Kuznetsov 等^[36]将该类微生物定义为首次培养仅能存活于极低有机碳水平(1–15 mg/L)培养基上的微生物类群; 同时, 把始终不能存活在富营养培养基上的微生物称为专性寡营养微生物, 而将既能在寡营养培养基上生长又能在富营养培养基上存活的微生物称为兼性寡营养微生物。值得注意的是, 寡营养微生物泛指能适应低水平营养生存条件的细菌, 而非微生物分类学上的专用术语, 如 *Proteobacteria*、*Planctomycetes*、*Bacteroidetes*、*Acidobacteria* 和 *Verrucimicrobia* 等都具有能在寡营养生态中生存的物种, 但它们在系统发育上则分属不同的微生物门类^[37]。前文所述 Vancanneyt 等分离到的 *S. alaskensis* 是寡营养微生物的模式代表^[38], 该种仅能在低于 5 mg/L 有机碳水平的环境中存活, 具有微小的体积和极低的生长速率, 其营养转运体系极其有效。这些成功培养的寡营养微生物有助于我们了解细胞的生理、生态、遗传发育, 其在生态系统中的分布和生态作用引起了研究者的广泛关注。

4 营养物质浓度影响微生物生长的机理

4.1 贫营养环境下微生物的营养策略

目前已知的长期处于营养限制条件下缓慢生长的微生物的生存策略如下: (1) 体积远小于快速生长的微生物, 当细胞直径减少, 表面积和体积之比将增加, 意味着养分同化的能力和养分运输效率的增加。水生生境中细菌细胞的直径范围通常为 0.5–1.0 μm ^[39], 而此范围内, 表面积和体积比值变化幅度最大。(2) 更灵活的基因调控机制和酶活控制策略^[40–41]。当某类营养物质缺乏时, 激活该营养物质相关的膜结合透性酶, 诱导合成新的高亲和力透性酶, 或激活替代营养物质的透性酶, 或者下调胞内代谢与合成速率, 尤其是核糖体的合成速率, 仅维持生命所需的最低物质消耗。(3) 储存聚合物, 如储存作为碳源的糖原、淀粉等以及多聚磷酸酯等。如果某种养分资源的运输速率超过了其同化作用的速率, 聚合物会积累储备以供以后使用。Button 等^[42–43]认为贫营养的环境类似海洋, 不稳定的有机碳含量限制了细菌的群体数量, 所以微生物的生存策略为最大限度地运输可溶性有机碳。

4.2 贫营养环境中的微生物转移到富营养培养基中可能产生自身代谢毒害

人们试图培养营养贫乏生态环境中的微生物时, 应考虑到它们细胞的生理状态。Koch^[44]总结了现有的研究结果, 列出一系列为什么寡营养微生物可能被高浓度营养物质杀死的可能原因, 即恒定的培养条件以及突然的营养变化凸显了一些细菌固有的基因缺陷, 甚至成为主要的生长障碍, 包括: (1) 有毒物质的形成, 例如半乳糖苷增多、氧代谢形成有毒产物或自由基积累过快不可逆转的对部分细胞造成损伤。(2) 大量的非代谢物质使细胞驱动力大量消耗, 细胞壁和细胞质生长不均衡, 膜蛋白比例过高阻碍细胞质膜生长。(3) 细胞增殖机制失调。(4) 非选择性地泵入了大量无法利用的物质或毒性物质, 致使生长受阻。(5) 寡营养细菌的生存策略导致其具有高效的转运机制, 膜上的透性酶对外部物质的转运过于迅速, 高浓度的营养物质改

变了寡营养微生物的渗透压,导致渗透膨胀;另外,长期处于贫营养环境的细胞可能具有广泛地运输一系列营养物质的能力,但其运输及代谢中间产物的能力非常有限。比如贫营养水体中的微生物多数具有高效的丙氨酸运输系统,并缺乏一些代谢中间产物(比如琥珀酸、丁二酸等)转运系统^[45],这能有效避免代谢物泄漏而适应贫营养环境。若为这类生物提供丰富的培养基组分会制约其复苏和生长,从而进入 VBNC 状态^[46],甚至导致死亡。

5 小结

综上所述,由于微生物生存环境的复杂性,在三十多亿年的进化历程中适应环境变化的微生物得以保留,拥有了多种多样的生理代谢途径。提高微生物细胞的可培养性不应局限于应用现有的一种或几种方法,而应该根据微生物的生态环境及生理状况设计合理的培养策略,尝试多种培养方法。本文仅综述了一些提高微生物可培养性的策略,特别强调了培养基的营养水平是重要因素。可以看到不久的将来,更多未培养微生物将被培养,这将极大地促进研究者对微生物在地球环境变化过程中的作用和地球生态系统演化过程中的功能的认知,为环境保护和社会可持续发展、生物技术产业革命等提供更多的微生物资源和措施方案。

参 考 文 献

- [1] Newman DK, Banfield JF. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1071-1077
- [2] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1127-1129
- [3] Stackebrandt E, Embley TM. Diversity of uncultured microorganisms in the environment[A]/Colwell RR, Grimes DJ. *Nonculturable Microorganisms in the Environment*[M]. Berlin: Springer, 2000: 57-75
- [4] Chen CY, Liu L, Ben KL. Thermostable DNA polymerases from thermus[J]. *Biotechnology*, 2001, 11(4): 31-34 (in Chinese)
陈朝银, 刘丽, 费昆龙. 栖热菌属热稳定 DNA 聚合酶[J]. *生物技术*, 2001, 11(4): 31-34
- [5] Tang B, Tang XF, Peng ZR. Advances in psychrophiles study[J]. *Journal of Microbiology*, 2002, 22(1): 51-53 (in Chinese)
唐兵, 唐晓峰, 彭珍荣. 嗜冷菌研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2002, 22(1): 51-53
- [6] He ZG, Li YQ, Zhou PJ. Study on reclassification of extremely thermoacidophilic archaea strain S5[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2001, 41(3): 259-264 (in Chinese)
何正国, 李雅芹, 周培瑾. 极端嗜酸热古菌 S5 菌株的重新分类研究[J]. *微生物学报*, 2001, 41(3): 259-264
- [7] Ma YH. Alkaliphilic microbes[J]. *Microbiology China*, 1999, 26(4): 309 (in Chinese)
马延和. 嗜碱微生物[J]. *微生物学通报*, 1999, 26(4): 309
- [8] Ren PG, Zhou PJ. Research progress of moderately halophilic eubacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(3): 427-431 (in Chinese)
任培根, 周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展[J]. *微生物学报*, 2003, 43(3): 427-431
- [9] Li XG, Xu J, Xiao X. High pressure adaptation of deep-sea microorganisms and biogeochemical cycles[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 59-70 (in Chinese)
李学恭, 徐俊, 肖湘. 深海微生物高压适应与生物地球化学循环[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 59-70
- [10] Yue XJ, Yu LY, Zhang YQ. Progress in research of microorganisms of natural environments in the viable but non-culturable state[J]. *Microbiology China*, 2004, 31(2): 108-111 (in Chinese)
岳秀娟, 余利岩, 张月琴. 自然界中处于 VBNC 状态微生物的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(2): 108-111
- [11] Simu K, Hagström A. Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(4): 2445-2551
- [12] Chen TS. *Manufacture and Application of Microbial Culture Media*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 6-7 (in Chinese)
陈天寿. 微生物培养基的制造和应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 6-7
- [13] Winterberg H. Zur methodik der bakterienzählung[J]. *Medical Microbiology and Immunology*, 1898, 29(1): 75-93
- [14] Staley JT, Konopka A. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1985, 39(1): 321-346
- [15] MacArthur RH, Wilson EO. *The Theory of Island Biogeography*[M]. Princeton: Princeton University Press, 1967
- [16] Button DK, Schut F, Quang P, et al. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 881-891
- [17] 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): 2150-2160
- [18] Franklin RB, Garland JL, Bolster CH, et al. Impact of dilution on microbial community structure and functional potential: comparison of numerical simulations and batch culture experiments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(2): 702-712
- [19] Kenters N, Henderson G, Jeyanathan J, et al. Isolation of previously uncultured rumen bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 84(1): 52-60
- [20] 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
- [21] 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
- [22] Leadbetter JR. Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(3): 274-281

- [23] Hattori T, Mitsui H, Haga H, et al. Advances in soil microbial ecology and the biodiversity[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1997, 72(1): 21-28
- [24] 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
- [25] Schmidt TM, Schaechter M. Topics in Ecological and Environmental Microbiology. Low-Nutrient Environments[M]. New York: Academic Press, 2012: 437-453
- [26] Jannasch HW, Jones GE. Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration[J]. Limnology and Oceanography, 1959, 4(2): 128-139
- [27] Kjelleberg S, Marshall KC, Hermansson M. Oligotrophic and copiotrophic marine bacteria-observations related to attachment[J]. FEMS Microbiology Letters, 1985, 31(2): 89-96
- [28] Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(1): 1-7
- [29] Maki JS, LaCroix SJ, Hopkins BS, et al. Recovery and diversity of heterotrophic bacteria from chlorinated drinking waters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 51(5): 1047-1055
- [30] Ishida Y, Kadota H. Growth patterns and substrate requirements of naturally occurring obligate oligotrophs[J]. Microbial Ecology, 1981, 7(2): 123-130
- [31] 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
- [32] Cho JC, Giovannoni SJ. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 432-440
- [33] Dai X, Wang BJ, Huang Y, et al. Bacterial diversity in the sediments of Taihu Lake by using traditional nutrient medium and dilution nutrient medium[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(2): 161-165 (in Chinese)
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
- [34] Hahn MW, Stadler P, Wu QL, et al. The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 57(3): 379-390
- [35] Gasol JM, Morán X. Effects of filtration on bacterial activity and picoplankton community structure as assessed by flow cytometry[J]. Aquatic Microbial Ecology, 1999, 16(3): 251-264
- [36] Kuznetsov SI, Dubinina GA, Lapteva NA. Biology of oligotrophic bacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 1979, 33(1): 377-387
- [37] Tian T, Li DM, Dai SK, et al. Culture methods of the oligotrophic marine microbe[J]. Microbiology China, 2009, 36(7): 1031-1039 (in Chinese)
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
- [38] Vancanneyt M, Schut F, Snauwaert C, et al. *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(1): 73-79
- [39] Button DK, Robertson BR, Jüttnerb F. Microflora of a subalpine lake: bacterial populations, size and DNA distributions, and their dependence on phosphate[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1996, 21(2): 87-101
- [40] Tempest DW, Neijssel OM, Zevenboom W. Properties and performance of microorganisms in laboratory culture; their relevance to growth in natural ecosystems[A]//Symposia of the Society for General Microbiology[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1983
- [41] Koch AL. Microbial physiology and ecology of slow growth[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(3): 305-318
- [42] Button DK. The physical base of marine bacterial ecology[J]. Microbial Ecology, 1994, 28(2): 273-285
- [43] Button DK. Nutrient uptake by microorganisms according to kinetic parameters from theory as related to cytoarchitecture[J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3): 636-645
- [44] Koch AL. Oligotrophs versus copiotrophs[J]. Bioessays, 2001, 23(7): 657-661
- [45] Ostrowski M, Fegatella F, Wasinger V, et al. Cross-species identification of proteins from proteome profiles of the marine oligotrophic ultramicrobacterium, *Sphingopyxis alaskensis*[J]. Proteomics, 2004, 4(6): 1779-1788
- [46] Xu HS, Roberts N, Singleton FL, et al. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment[J]. Microbial Ecology, 1982, 8(4): 313-323