专论与综述

未培养环境微生物培养方法的研究进展

熊盈盈[1,2]　莫祯妮[1,2]　邱树毅[*1,2]　曾祥勇[*1,2]

1 贵州大学酿酒与食品工程学院　贵州 贵阳　550025

2 贵州大学贵州省发酵工程与生物制药重点实验室　贵州 贵阳　550025

摘　要:自然界中微生物种类繁多、功能多样、分布广泛,对人类健康安全、生态稳定和物种进化等发挥不可替代的作用。尽管微生物培养技术至今已有一百多年,然而由于各种限制因素的制约,目前成功分离培养的微生物仅占 0.1%−1.0%,自然界中仍有十分丰富的微生物资源有待挖掘和开发利用。如何理解难培养微生物的制约因素并探索作用机制,同时借此开发新型微生物培养方法则尤为必要。本文首先分析了典型环境微生物生长的限制因素,然后介绍了目前利用传统培养改进措施进行分离筛选的研究成果,进一步综述了原位培养、共培养、微流控培养技术、细胞分选技术等新型培养技术在难培养微生物分离培养中的应用,最后对目前培养法存在的瓶颈问题进行深入分析,提出今后可在多技术联合使用、难培养微生物复苏机制、微生物互作机制、代谢途径与调控机制等方面进行研究,以期为今后微生物资源开发利用提供借鉴。

关键词:未培养微生物,复苏,原位培养,共培养,微流控培养技术

Research progress on culture methods of uncultured environmental microorganisms

XIONG Yingying[1,2]　　MO Zhenni[1,2]　　QIU Shuyi[*1,2]　　ZENG Xiangyong[*1,2]

1 School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China

2 Guizhou Provincial Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biological Pharmacy, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract: Many kinds of microorganisms with several robust functions are widely distributed and abundant in the natural environment, playing critical roles in human health and safety, ecological stability and species evolution. Although microbial cultivation technologies have been developed for more than one hundred years, by far, succeeded isolated microorganisms only account for 0.1%−1.0% of the total microorganisms in the planet due to plenty of limitation factors. Abundant microbial resources in the natural environments remain to be explored and applied. Therefore, it is particularly necessary to understand the restricting elements for cultivation of microbes and elucidate mechanisms, develop novel

and effective methods of microbial isolation and culture. This paper analyzes the constraint factors for the growth of typical environmental microorganisms, then shows findings on the improvements of culture media and conditions. Subsequently, applications of novel techniques in microbial isolation such as *in situ* cultivation, co-culture, microfluidics cultivation and cell-sorting are reviewed, finally, the present bottleneck problems constraining uncultured microbes are discussed. The integration of multiple technologies, microbial interactions, metabolic pathway and mediation mechanisms, resuscitation mechanisms should be considered in the near future. Hopefully, it can provide a basic reference for the development and utilization of microbial resources.

地球生物圈中微生物种类繁多、功能多样，它们扮演着生产者、消费者和分解者的角色，广泛参与碳、氮、硫等各种生物地化循环。据推算，大约有 10^{11}–10^{12} 种微生物存在于地球的各个生物圈中[1]。利用传统培养法分离微生物至今 150 多年，成千上万种微生物得以分离，但截至目前可培养微生物仅占总微生物的 0.1%–1.0%[2]。绝大部分微生物无法培养，这些微生物常常被称为"暗物质"。尽管随着基于聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction，PCR)，如克隆文库、变性梯度凝胶电泳(Denatured Gradient Gel Electrophoresis，DGGE)、荧光原位杂交技术(Fluorescence *in situ* Hybridization，FISH)、实时荧光定量 PCR (Real-Time Quantitative PCR，qPCR)、限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism，RFLP)和高通量测序等分子生物技术的蓬勃发展，越来越多的微生物通过免培养技术被发现，功能基因被陆续挖掘并利用。然而这些分子生物技术并不能替代培养法。其原因在于，即使通过(宏)组学技术发现了代谢途径独特新颖、功能强大的微生物，如果不能分离筛选这些微生物，其生理特点、代谢机制及生态功能就无法研究验证，应用也就无从谈起[3]。因此，测序法和培养法应互为补充，缺一不可。近年来，绝迹稀释法(Dilution-to-Extinction)、原位培养、共培养(Co-Culture)、流式细胞分选技术及微流控培养技术等新型培养方法陆续出现，为高效地分离筛选更多微生物带来了曙光。

本文首先分析了环境微生物生长的典型限制因素。然后，对传统培养法的改进措施、新型培养手段(原位培养、高通量培养法、微流控培养技术等)的原理、特点及优缺点进行介绍，分析并总结现今培养法的研究成果。最后，对目前培养法的瓶颈问题进行分析并提出解决措施，以期为今后利用培养法分离筛选更多微生物，特别是难培养的功能微生物的培养提供参考。

1 未培养环境微生物生长的限制因素

自然界中生长的微生物在现有培养条件下不能生长，原因可能有 7 种。

1.1 大多数未培养微生物处于活的非可培养状态

自然环境中有 99%以上的微生物处于活的非可培养(Viable but Non-Culturable，VBNC)状态[4]。另外，人工实验条件会引起生长环境的改变，使原本能通过常规方法正常分离培养的环境微生物因无法适应而进入 VBNC 状态。这些 VBNC 微生物大多处于休眠状态，仅维持着最低代谢活性。然而，目前在实验室通过常规手段根本无法使其复苏并分离培养[4]。

1.2 微生物的丰度和竞争能力低

在自然界复杂的微生物群落中，存在许多丰度低但代谢功能强的微生物[5]。鉴于目前研究人员仍无法确定这些低丰度微生物中相对丰度最高的微生物所生长的自然环境，导致无法进行有效富集；另外，即使某些微生物丰度相对较高，但如果培养基中底物丰富或以发酵底物作为碳源，在分离培养时，生长更快的微生物有可能迅速战胜生长缓慢的目标微生物，所以竞争力低仍可能导

致培养失败[5]。

1.3 无法模拟微生物生长的真实自然环境

由于对目的微生物所栖息的自然环境缺乏深入理解，例如，对微生物生长代谢过程中起关键作用的营养因子、不同生理阶段对基质浓度的需求、生长所需环境条件的变化规律等知识严重认识不足，导致在实验室条件下无法提供目的微生物生长所需的真实营养需求及培养条件。某种关键营养因子或生长条件不能满足往往会导致微生物的培养失败[6]。

1.4 生长速率较低，检测手段不够灵敏

一些寡营养或生长缓慢的微生物细胞组成的超微型菌落，如果培养时间不够或者检测技术灵敏性不高，那么这些微生物的生长就不易被发觉，往往被忽略，表现为"未培养"[7]。

1.5 培养基富营养化

由于自然界中数量庞大的环境微生物可利用的营养物质比较匮乏，多数处于"寡营养"状态[8]。高浓度营养物质比较适合生长快且对其有抵抗能力的微生物，但可能会抑制那些生长速度较慢的微生物[9]，寡营养培养基可用于培养生长缓慢的细菌[10]。当微生物处于寡营养水生环境时，如果转移到富营养培养基中，会因不适应而突然死亡[10]。

1.6 破坏或者忽视了环境中微生物之间的相互作用

自然界中的所有微生物并不是孤立存在，而是相互联系和影响的。许多微生物之间可进行物质交换和信号交流，它们联系紧密甚至高度依存。然而在实验室采用传统培养法分离筛选目的微生物时会人为破坏这种依存关系，导致分离培养的失败[11]；另外，当前对环境微生物之间的这种高度复杂的互作机制研究并不多，认识不够深入、全面，导致不能指导难培养微生物的分离。

1.7 病毒感染导致的培养效率降低

某些海洋环境样品中，7%的菌群携带病毒，表层海水死亡细菌中大概 10%−50%是由病毒感染引起的[12]。

2 环境中未培养微生物培养方法的开发与应用

2.1 常规培养方法的改进

环境微生物的生长除了需要适宜的生长条件和常规的碳源、氮源等营养物外，可能更需要信号分子、关键酶或蛋白及电子供体/受体等某些关键营养物质，这些关键物质或有利于关键生化反应生物酶的合成而维持微生物必需的生命代谢活动，或可促进处于 VBNC 状态的微生物复苏以恢复其活性。

2.1.1 培养基的优化与调整

(1) 添加抑制剂、样品抽提液或菌液

添加某种抑制剂(如抗生素)以抑制非目的菌的生长。本课题组以酱香型大曲为研究对象，对培养基进行改进，添加抑制剂结合热处理，分离出一株耐热性良好的放线菌 FBKL4.010[13]。样品浸提液含有丰富的营养物质，向培养基添加浸提液是传统培养的重要手段。Nguyen 等利用土壤提取液(80%甲醇浸提)制备的强化培养基对根际土壤进行分离，成功培养了许多以前未培养的细菌菌株，化学分析结果表明，土壤浸提液中含有低分子量有机物组分供微生物生长[14]。另外，Xian 等利用 *Tepidimonas* SYSU G00190W 上清液的改良培养基，用于西藏和云南温泉样品中 *Chloroflexi* 的定向分离，从这些培养基中分离出的大多数菌落为未培养的 *Chloroflexi*，其中 36 个为潜在新物种；代谢组学研究表明，培养上清液含有多种低分子量的有机基质，可作为这些细菌生长的潜在营养物质[15]。

(2) 添加信号分子、电子供受体等物质

在自然环境复杂的微生物群落中，微生物之间紧密联系、相互作用，它们之间通过信号分子进行信息交流。研究表明，信号分子环磷酸腺苷(Cyclic Adenosine Monophosphate，cAMP)和酰基

高丝氨酸内酯(Acyl-Homoserine Lactones，AHL)可显著提高海洋细菌的培养效率[16]。Bruns 等向培养基中加入 AHL、cAMP 等信号分子对富营养化湖泊天然浮游细菌进行培养，发现这种方法能促使细菌得到培养。其中，cAMP 是最有效的信号分子，10 μmol/L cAMP 可使约占总数 10%的微生物细胞培养出来，但培养出来的细菌如果不继续添加信号分子，则又停止生长[17]。高丝氨酸内酯(Homoserine Lactones，HSL)作为群体感应信号分子可改善微生物的培养状况[18]。Guan 等向含低浓度铁的培养基中加入外源的铁载体和 C8-HSL，发现原本在低浓度铁培养基上不能生长的海洋细菌也能形成菌落[19]。此外，根据微生物的特性，添加生长所需的电子供受体也可提高微生物可培养率[11]。Sorokin 等以甲酸盐或氢作为电子供体，以单质硫、硫代硫酸盐或二甲基亚砜作为电子受体，对高盐环境的沉积物样品进行分离培养，最终分离到 *Halodesulfurarchaeum* 新属的 8 株菌[20]。

(3) 添加维生素、生物酶或蛋白因子

Harbison 等通过向培养基中添加维生素，从酸性沼泽中分离出一种专性厌氧、嗜酸的 α-变形菌门(*Alphaproteobacterium*)新菌株，命名为 CS4[T21]。另外，有研究者通过添加生物酶来提高微生物可培养率。Kim 等通过向培养基中添加 H_2O_2 酶，成功分离培养了 2 株淡水放线菌 acI 谱系的新菌株，即 *Prochlorococcus* 和 *Pelagibacter*[22]；同时，添加超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase，SOD)和 H_2O_2 酶等可降低培养过程中优势菌种代谢所产生的自由基、过氧化物和一些拮抗物质的毒害作用，使微生物的培养效率提高[23]。对于 VBNC 微生物，添加藤黄微球菌分泌的复苏促进因子(Resuscitation-Promoting Factor，Rpf)有助于促进其复苏和生长[24]。余晓云利用藤黄微球菌 Rpf 从新疆土壤极端环境中分离筛选 VBNC 状态菌，共分离得到 60 株菌，其中 VBNC 菌 48 株，14 株为潜在新种[25]。翟竟余也对制药废水样品进行 VBNC 菌的分离筛选，共获得了 23 株 VBNC 菌，包括 *Pseudomonas* 属内的新种细菌 *Pseudomonas pharmacopolae* sp. nov.[26]。

(4) 其他凝固剂代替琼脂或改进琼脂培养基制备方法

琼脂作为常规培养基的凝固剂，对某些微生物具有一定程度的毒害作用，从而降低了可培养率；而使用结冷胶作为凝固剂不仅对微生物没有毒害作用，还可能增强受琼脂抑制微生物的生长，凝固效果比琼脂更好[27]。2005 年，Tamaki 等研究发现结冷胶培养基上的菌落数比琼脂培养基上的多 10 倍，约 60%为新种[28]。2009 年，该团队又比较了琼脂和结冷胶对从淡水沉积物中微生物菌落形成的影响，结果发现，108 株菌中有 22 株只能在结冷胶培养基上形成可见菌落，并表现出新种的潜质，剩下的 86 株在琼脂和结冷胶上都生长，但其中 52 株在结冷胶上生长得更快；此外，结冷胶还显著地促进了具有代表性的生长缓慢微生物 *Gemmatimonas aurantiaca* 的菌落形成[29]。

除了用结冷胶代替琼脂之外，有研究者还通过改进琼脂培养基的制备方法来提高微生物的可培养性。2014 年，Tanaka 等使用 *Gemmatimonas aurantiaca* T-27T 和 3 种代表性的环境样品(土壤、沉积物和水)作为接种物，综合比较了 PT 培养基(将磷酸盐和琼脂同时灭菌)和 PS 培养基(将磷酸盐和琼脂分别灭菌)上的菌落数目情况，结果表明，PS 培养基上的菌落数更多，对 PT 培养基进行化学分析表明 H_2O_2 抑制了微生物生长[30]。2018 年，Kato 等也利用 PT 培养基和 PS 培养基同时分离筛选森林土壤或池塘底泥的微生物，结果发现，在 PS 培养基上的菌落数目明显多于 PT 培养基，经过 7 d 以上的培养分别从 PS 培养基和 PT 培养基中分离出了 98 株和 74 株菌落作为慢速生长菌，通过 PS 培养基筛选到了一株 α-变形菌门的新菌株[31]。另外，其他研究者通过 PS 培养基分离筛选到难以培养的烷烃降解菌[32]和放线菌[33]。

对培养基进行优化与调整的方法经济实用、针对性较强、操作较简单，但对于一些需要其他菌株辅助才能生长的类群分离效果就较差。同时，由于人们对某些微生物的认识不全面，因此难以根据微生物的特性来设计合适的培养基。

2.1.2 培养条件的优化

(1) 延长培养时间

延长培养时间可大幅度提高未培养微生物的培养率，有利于生长缓慢的微生物生长，但应注意控制培养时间，因为培养时间越长，对微生物培养环境的无菌要求就越高[34]，而且培养基的营养成分会随时间推移发生改变，可能会对微生物的生长产生不利的影响。Choi 等通过采用寡营养培养基和延长培养时间从海洋沉积物中分离微生物，分离出 2 株新海洋细菌，即 *Mooreiaceae* 和 *Catalimonadaceae*[35]。Sun 等在处理高浓度有机废水的中温升流式厌氧污泥床反应器中，采用富集培养基并延长培养时间对微生物进行培养，培养 14 d 后，成功地从污泥中分离出一株新厌氧菌 TC1^T，将其命名为 *Flexilinea flocculi* gen. nov. sp. nov.[36]。Pulschen 等通过采用寡营养培养基、延长培养时间及选择生长缓慢的细菌，从南极土壤样本中分离微生物，成功地分离出了一些稀有的微生物，如 *Lapillicoccus*、*Flavitalea*、*Quadrisphaera*、*Motilibacter* 和 *Polymorphobacter*[37]。贺瑞含从南北极环境中采集不同类型的样品，通过改进培养温度、延长培养时间，采用稀释 R2A 培养基分离出细菌约 1 220 株，其中包括 182 个潜在新物种[38]。

(2) 绝迹稀释法

绝迹稀释法(Dilution-to-Extinction)是通过将环境样品中微生物群体总数稀释至痕量后再进行培养的方法[39]，该方法降低了优势微生物的占比，可提高寡营养微生物的可培养率[40]。Stingl 等采用改进的绝迹稀释法从俄勒冈海岸和百慕大海域中培养微生物，分离出 17 株 SAR11 新菌株，以及几株以前未培养的细菌种类[41]。Colin 等采用绝迹稀释法将河口沉积物稀释至痕量后，采用 384 微孔细胞培养板分离硫还原菌，筛选到很多硫还原菌新种[39]。Jimenez-Infante 等采用绝迹稀释法将红海表层水样接种于改良的低营养培养基，培养 4 周，结果得到 2 株 SAR11 新菌株，分别命名为 RS39 和 RS40[42]。Bartelme 等采用绝迹稀释法将从针叶林浅表层土壤中提取的微生物细胞稀释后，分别接种于 2 种培养基(这 2 种培养基的氨基酸和有机碳浓度相差 100 倍)，于 96 孔板、16 ℃ 下进行培养，共分离出 133 株菌，其中包括以前未培养的菌株，这些菌株与 *Nakamurella*、*Nocardioides*、*Mycobacterium*、*Jatrophihabitans*、*Patulibacter*、*Conexibacter*、*Rhizobiales* sp.、*Reyranella* 和 *Microtrichales* sp. strain AZCC_0197 的序列最大相似性小于 97%[43]。Henson 等采用绝迹稀释法培养浮游细菌，成功分离了 8 个新属和 7 个新种的菌株[40]。

绝迹稀释法一般采用 96 孔或者 384 孔板进行高通量并行操作，提高了分离效率，但操作较复杂，周期较长。同时，由于每个孔的顶部空间是完全隔离的，因此很难供应气态底物；此外，当以小体积培养细胞时，由于孔内液体蒸发会导致培养物变干，从而不利于微生物生长[5]。

2.2 共培养

自然生境中微生物之间的相互作用对群体生存来说非常重要[44]。这些相互作用通常是通过环境改变来介导的，微生物通过占用资源和排泄代谢产物来改变环境，从而影响自身和其他微生物的生长[45]。大多数共生菌对体外培养有抗性[46]，对相邻细菌产生的信号和化学因子的生长依赖性可能是阻碍细菌离体生长最重要的因素[6]。营养缺陷型细菌的基因组较小，缺乏必要的遗传物质来编码必需的营养素，通常需要与其他细菌建立紧密的共生关系才能生存[6]。

自然生境中许多细菌依靠共生关系维系生长，有研究者通过添加细菌进行共培养来提高培养率，如：Nichols 等通过添加辅助菌株分离出一种新的嗜冷杆菌属[47]；海洋沉积物中的自养氨氧化古生菌在与硫氧化细菌共培养时被成功地富集

和培养[48]；D'Onofrio 等发现在海洋沉积物中广泛存在铁载体依赖的未培养细菌，来自邻近物种的铁载体可以诱导其生长[49]；共生异养菌(如交替单胞菌 *Alteromonas* 等)可通过清除 H_2O_2 促进原绿球藻属(*Prochlorococcus*)的生长[50]。此外，交互共生培养法(Cross-Feeding Cultivation)也可提高培养率，如 Kaeberlein 等研究发现虽然菌株 MSC1 和MSC2 很容易在培养皿中维持生长，但只能在共培养中实现，同样，MSC1 可以在培养皿中与另外 2 株菌(MSC4 和 MSC5)中的任意一株进行共培养[51]；Bhuiyan 等报道了由菌株 GF9 (*Sphingopyxis*)产生的卟啉型生长因子 A-F 在皮摩尔到纳摩尔浓度下，可诱导先前未培养的菌株 ASN212(*Leucobacter*)显著增殖，但却对产生菌 GF9 自身产生了毒性，GF9 菌株与 ASN212 菌株的共培养试验表明，ASN212 菌株有助于 GF9 菌株长期培养[52]；吴家法对共培养 30 d 后的微包埋微生物采用流式细胞仪分选，分选后分别用 MR2A 和共培养流出液进行培养，结果获得了 100 株细菌，其中 8 株疑似新种[53]。

共培养作为一种新型培养法，考虑了真实自然环境下微生物互作对微生物生长的影响，对于互生或共生关系的微生物针对性较强。但由于当前对微生物间的互作机制及其对生长特性的影响研究有限，所以成功筛选出的难培养微生物种类并不多，需要进一步加大微生物互作与生长之间关系的研究。

2.3 原位培养

原位培养是将稀释的环境样品置于区室独立小孔中，用半透性膜(0.03 μm/0.2 μm)上下封闭小孔，最终将其放回原来所栖息的自然环境或模拟生境中进行培养。装置的孔之间互不干扰，由于半透膜的选择性，孔内外的微生物细胞无法进出半透膜，但自然环境中的某些信号分子或关键营养因子等小分子能穿透半透膜进入孔中，为微生物所利用，进而促进孔中难培养微生物的生长。原位培养法主要包括扩散室法、分离芯片法、Trap技术、I-tip 技术和胶囊包埋技术。这些方法都是通过模拟目标微生物的自然环境进行分离培养，有利于微生物与微生物或与自然环境之间建立化学交流。有关原位培养方法的开发与应用如表 1所示。

2.3.1 扩散室

2002 年，Kaeberlein 团队设计了一种名叫"扩散室"(Diffusion Chamber)的装置(图 1)，可用于培养海洋潮汐带沉积物中的微生物，装置由金属环(垫圈)和紧贴两侧的半透性薄膜(孔径为 0.03 μm)构成[51]。将样品琼脂混合物注入装置密封后进行原位培养，培养过程中，营养物质会通过下层薄膜扩散到中间垫圈满足微生物生长，装置中的微生物也可与自然环境建立化学交流；但因薄膜孔径很小，所以装置内外的微生物不能相互扩散[51]。利用扩散室能提供环境微生物生长所需的营养，而不必弄清其确切成分，方便便捷；但仍存在一定的局限性，比如通过扩散室培养的环境细胞形成的菌落一般很小，肉眼不可见[63]，较难检测和分离，也就很难进行高通量培养分离[73]；样品的稀释水平会影响扩散室培养微生物的效果；对平板制作和膜材料选择要求也较高，不能破坏微生物生长[11]。

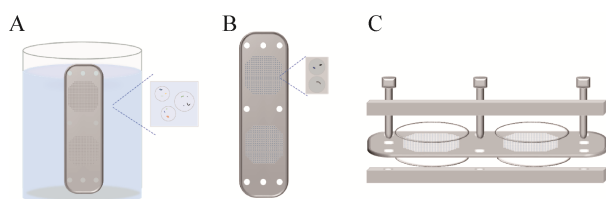在此基础上，不同类型膜基系统已被开发并应用到自然环境样品的分离培养中，很多缓慢生长的菌落也可被成功培养[44]。

2.3.2 分离芯片

在开发应用扩散室法培养微生物的基础上，Nichols 等开发了一种名叫"分离芯片"(Isolation Chip，ichip)的高通量分离装置(图 2)，可用于大量分离培养环境中的未培养微生物[62]。使用时，将有上百个通孔的分离板放在已稀释的含样品微生物细胞的培养基悬液中(图 2A)，使每个通孔捕捉到含有适量微生物细胞的培养基(图 2B)，最后将分离板夹在聚碳酸酯膜(孔径为 0.03 μm)与上下两层板构成的半透性屏障中间(图 2C)，将装置置于目标微生物所栖息的环境中进行原位培养[62,74]。

表 1 原位培养的应用
Table 1 Applications of *in situ* cultivation

Types	Year	Method description	Findings	References
Diffusion Chamber	2002	Using a diffusion chamber to cultivate sediment microorganisms in marine intertidal zone	The MSC2 can be *in situ* cultured in a diffusion chamber with 97% similar to *Arcobacter nitrofigilis*	[51]
	2007	Isolating uncultured microorganisms in sediment and water based on diffusion chamber cultivation method	A variety of uncultured bacteria belonging to *Deltaproteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes*, and *Acidobacteria* have been isolated	[54]
	2009	Cultivating soil samples by the combination of diffusion chamber, immunofluorescent viability staining and micromanipulation	Some novel types of microorganisms difficult to cultivate have been isolated, such as a plant pathogen *Leifsonia xyli*	[55]
	2009	Developing a *in situ* cultivation device—hollow-fiber membrane chamber based on diffusion chamber, and applied it into an artificial environment simulating the natural environment where microorganisms inhabit	The number of microorganisms isolated by hollow-fiber membrane chamber is much higher than that of the traditional culture method	[56]
	2010	Applying diffusion chamber to cultivate microorganisms in the polluted sediments	Many pure culture strains taxonomically classified as *Alpha-*, *Beta-*, and *Gamma-proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, etc. have been isolated	[57]
	2014	Isolating bacteria in the sponge (*Rhabdastrella globostellata*) with diffusion chamber	After 4 weeks of *in situ* culture, 255 strains were obtained, of which 15 were identified as new species of *Bacteroides* and *Proteobacteria*	[58]
	2015	Applying a modified *in situ* cultivation device in the rhizosphere soil to screen actinomycetes	A total of 113 strains of actinomycetes were isolated, of which one strain showed the highest 90% similarity with *Nocardia* spp., and probably belongs to a new genus of actinomycetes	[59]
	2015	Isolating, identifying bacteria that is difficult to cultivate and previously uncultured from toxic heavy metal-contaminated soil based on the diffusion chamber method	A total of 260 strains of bacteria classified into 108 species, in 6 phyla and 1 unclassified type were isolated using both diffusion chamber and traditional culture technology. Most isolates (66.2%) were obtained only by the diffusion chamber method, including previously uncultured strains	[60]
	2019	Developing a new diffusion bioreactor to investigate the microorganisms in forest soil	35 previously uncultivated strains were successfully obtained using the new diffusion bioreactor. Additionally, the strain recovery rate can be improved through the soil collected in summer, a longer cultivation period and the use of a low-nutrition modified medium	[61]
ichip	2010	Designing and applying an ichip device in seawater and soil	Many seawater and soil microorganisms were isolated, among which the new species with the highest similarity less than 95% accounted for 28.3% and 28.7%, respectively	[62]
	2015	Applying *in situ* cultivation to isolate soil microorganisms	An uncultured *Eleftheriaterrae* sp. in *Beta-proteobacteria* was isolated	[63]
	2018	Separating soil microorganisms collected in two locations by an ihip device	The ichip method facilitated the cultivation of at least 28 species previously described as "uncultivated"	[64]
Trap	2008	Isolating filamentous actinomycetes in soil with a Trap device	Rare actinomycetes such as *Dactilosporangium*, *Catellatospora*, *Catenulispora*, *Lentzea*, *Streptacidiphilus* were isolated	[65]
	2012	Designing and using a *in situ* cultivation device-FPMT to separate microorganisms in two soil samples	The soil microbial diversity obtained by the FPMT method is much higher than that of the traditional plate streak method, also new species have been isolated	[66]
	2018	Screening bacteria in hot springs by a FPMT device	184 bacterial strains were isolated from 5 hot springs by both FPMT method and standard agar plate method. Among them, 7 new strains were obtained by FPMT method while only 1 strain by the latter method	[67]
I-tip	2014	Separating the symbiotic microorganisms in sponge by an I-tip device	34 species in 5 phyla were isolated by I-tip, but 16 species in 3 phyla were obtained by plate streak method	[68]
GMDs	2002	Designing and applying the capsule embedding technology in water and soil samples	More than half of 150 isolated bacterial strains were previously uncultured and their genome are firstly identified	[69]
	2009	Adopting a double encapsulation technique which coat diluted microorganisms with agar and polysulfonic polymeric membrane, and then cultivating samples of microorganisms from three different environments	Plenty of novel microorganisms have been successfully isolated, showing the maximum 85%−96% similarity with the known strains	[70]
	2010	Diluting the soil extractions with 0.185% NaCl solution, and adding different myxobacteria strains to the microdrop culture medium for enhancing cultivation in soil	A novel myxobacteria strain was isolated	[71]
	2017	Isolating bacteria in pit mud by the combination of microencapsulation culture method and cell sorting technology	Totally, 95 strains were isolated, among which 1 strain with multiple functions is classified as the Uncultured bacterium clone N8-7	[72]

图 1　扩散室装置[51]
Figure 1　Diffusion chamber for *in situ* microbial cultivation[51]
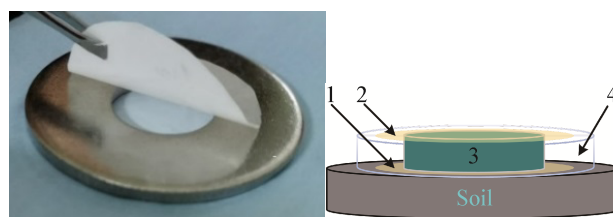

图 2　分离芯片[62]
Figure 2　Isolation chip (ichip)[62]

通过实验证明，这种方法分离得到的微生物数量远远超过了传统分离方法，而且更有可能分离到新物种[73,75]。其原因可能是 ichip 中的细胞与外界环境的距离较近，信息交流更方便，会促进细胞生长；采用 ichip 法可进行高通量的分离培养；用显微镜观察每个小孔中生长的微生物，避免了菌落观察不到而被忽略的问题[11]。

2017 年，Berdy 等分别比较了 ichip 法和平板法分离培养海洋底泥和土壤中的微生物，发现无论是菌落数、菌落形态以及新种数目，ichip 法均远远优于传统平板法；作者也总结了 ichip 法的不足：(1) 某些微生物的生长不仅依赖于在自然界中特定生长因子和/或邻近物种的代谢产物，而且还需要共生微生物的物理接触；(2) 该方法不能用于培养干旱环境的微生物；(3) 将 ichip 放置在水生沉积物表面，但沉积物表面常常出现含氧层，会导致 ichip 下形成缺氧环境，使 ichip 孔内的细胞接触的是非自然的环境[76]。以上这些限制都会影响样品微生物的分离培养。
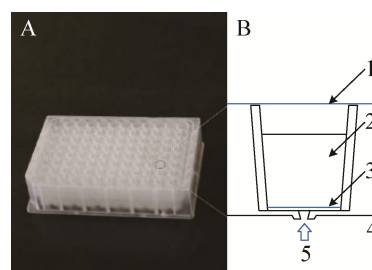
2.3.3　Trap 技术

鉴于扩散室不能对放线菌进行选择性的分离，Gavrish 等报道了一种用于分离丝状放线菌的 Trap 装置(图 3)，该装置的结构与"扩散室"相似，只是底部的半透膜孔径为 0.2−0.6 μm，孔径加大是为了能让菌丝体穿过半透膜进入生长盒，使用时将 Trap 装置(垫圈内最初为无菌固体培养基)置于盛有潮湿土壤样品的培养皿中，装置底部与土壤接触良好，丝状微生物选择性地渗入装置并形成菌落，黑暗条件下培养 14−21 d[65]。

2012 年，Jung 等开发了一种新 Trap 式的滤板微捕集器(Filter Plate Micro Trap，FPMT)；FPMT 是一种从自然环境中分离细菌的原位培养装置，以过滤微孔板为主体(图 4A)，长 12.4 cm、宽 8.1 cm、

图 3　Trap 装置及示意图[65]
Figure 3　Image and diagram of the trap[65]
注：1：底膜(孔径 0.2−0.6 μm)；2：顶膜(孔径 0.03 μm)；3：无菌琼脂或结冷胶培养基；4：塑料或金属垫圈
Note: 1: Bottom membrane filter (0.2−0.6 μm pore size); 2: Top membrane filter (0.03 μm pore size); 3: Agar or gellan gum; 4: Plastic or metal washer

图 4　UNIFILTER 过滤微孔板照片(A)和 FPMT 一孔示意图(B)[66]
Figure 4　Photograph of the UNIFILTER filtration microplate (A) and schematic diagram of one well of FPMT (B)[66]
注：1：盖子；2：培养基；3：PVDF 滤膜(孔径 0.45 μm)；4：土壤或者底泥样品；5：微生物
Note: 1: Cover; 2: Medium; 3: 0.45 μm pore size PVDF filter; 4: Soil or silt sample; 5: Microorganisms

高 3 cm，由 96 个独立的圆柱形空间作为培养微生物的腔室(图 4B)；培养时将装置放在土壤样品上，以诱集微生物进入腔室，微生物生长所需的某些营养物质也可扩散到培养基中[66]。

2.3.4　Isolation-Tip 技术

2014 年，Jung 等开发了一种名叫"Isolation-Tip (I-tip)"的装置(图 5)，可用于分离海绵共附生微生物。使用时，将装置插入海绵的不同组织处(深度为 0.5 cm)进行培养，4 周后将装置中富集的细菌用平板法再进行分离培养[68]。I-tip 法也存在一定的局限性，比如若要将装置应用在流动的海水中就需进行固定[77]。

2.3.5　胶囊包埋技术

胶囊包埋技术又称为单细胞封装培养法、凝胶微滴培养法(Gel MicroDroplets，GMDs)。Zengler 等设计了一个方法，将稀释后的环境样品与琼脂糖混合，乳化成微滴(即微滴包埋胶囊)，然

图 5　I-tip 装置示意图[68]
Figure 5　Schematic diagram of the I-tip[68]
注：1：黄色 Tip (20−200 μL)；2：微生物在 I-tip 中培养；3：50−100、150−212 μm 玻璃微珠；4：防水胶布；5：0.7%琼脂培养；6：微生物由此进入 I-tip
Note: 1: Yellow tip (20−200 μL); 2: Microbes are cultivated in I-tips; 3: 50−100, 150−212 μm glass beads; 4: Waterproof adhesive; 5: Medium with 0.7% agar; 6: Microbes can penetrate between beads

后将其装入层析柱内(层析柱用滤膜封口)，包埋胶囊在低营养的流动培养液中进行培养，再结合流式细胞仪分选技术，将包含有单菌落的胶囊分选到含有培养基的 96 孔板中继续培养，最终获得纯培养物[69]。这是一个开放连续补充营养的微系统，微生物间的代谢产物及信号分子可在胶囊间进行扩散而被其他菌利用[44]，较好地模拟了微生物的自然生长条件。该方法能高通量地分离培养微生物，而且更易进行下游的扩大培养，提高了微生物的培养率；但该方法成本较高、操作较复杂，而且存在一些技术问题，如包埋基质机械强度低、透性差、微生物热敏感等，因此还需要不断改进[78]。

原位培养技术通过模拟目标微生物的自然环境来分离培养微生物，有利于微生物与微生物或微生物与自然环境之间建立化学交流，可在一定程度上提高环境微生物的成活率以及未培养或稀有类群的培养率[79]，但其成本较高、下游的分离纯化鉴定工作量很大、周期较长、操作较复杂、可控性差，即将人为模拟自然环境条件下培养的微生物转移到实验室条件驯化时，若选用的培养基和培养条件不适宜某些微生物的生长，就会使分离效率降低。

2.4　微流控培养技术

微流控培养技术(Microfluidics Cultivation)是在微观尺寸下对复杂流体进行控制、操作和检测的技术，其能短时间同时检测多种未培养微生物的存在，还能获得目标微生物的纯培养物[80]。微流控培养和分析设备是在单细胞水平上研究微生物相互作用的通用工具，与传统培养方法相比，该技术制造工艺和技术设备复杂、专业性强[81]。

2014 年，Najah 等采用一种超高通量的液滴微流控技术，在不到 20 min 的时间内筛选超过 100 000 个细胞；通过将单个细菌在 20 μL 液滴(含荧光纤维二糖水解酶底物的培养基)中隔室分离，直接从麦芽地筛选未培养细菌；根据纤维二糖水
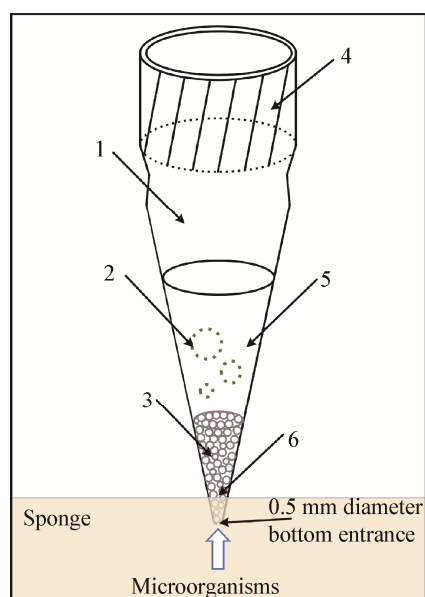
解酶活性对液滴进行分选后，细菌种群的纤维二糖水解酶和内切葡聚糖酶活性分别提高了 17 倍和 7 倍，并且与选择在含有淀粉和羧甲基纤维素作为碳源的培养基上生长时相比，分类学上的差异非常大[82]。2016 年，Jiang 等建立了一种微流控划线平板法(Microfluidic Streak Plate，MSP)，从多环芳烃富集的土壤中分离到了许多未培养微生物，包括一株能降解荧蒽 (Fluoranthene) 的芽生球菌(*Blastococcus*)新种[83]。2019 年，赵莹彤等设计并制备了一种微流控芯片，其单个元件是由上部带有凹槽的"U"型结构组成，该芯片能捕获真菌单细胞，对单细胞可正常培养 48 h 以上，并且能观察到酵母出芽、孢子萌发等过程，可用于真菌单细胞的捕获、培养、定位和实时观察，具有简单、方便、直观的特点[84]。

2.5 基于细胞分选的培养技术

细胞分选技术通常用来从复杂的微生物群落中分离单个细胞并进行培养。目前细胞分选技术包括光学镊子和荧光激活细胞分选 (Fluorescence Activated Cell Sorting，FACS)等，常与微液滴或微流控技术相结合。Irie 等报道了一种利用细胞分选系统对活性污泥微生物群落中未培养的嗜酸菌和硝化螺菌进行物理富集的新方法[85]。Abe 等报道了一种基于散射特征的高通量分离技术，将氨氧化细菌菌落直接从活性污泥中分离出来，避免了长时间培养和富集偏差，接种到含培养基的 96 孔板中进行培养，成功地分离出了亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)中的新菌株[86]。Fujitani 等利用前向散射 (Forward Scatter，FSC) 和侧向散射 (Side Scattering，SSC)结合的方式从富集样品中分离得到了 3 株硝化螺菌属中未培养的菌种[87]，并报道了一种针对硝化细菌微菌落形成的分离方法[88]。与传统的细胞分选机制不同，此技术既能保证培养条件，又规避了种间竞争的影响，但该方法建立的时间较短、技术还不够成熟，还需继续探索[80]。

3 总结与展望

随着以原位培养、微流控培养技术和细胞分选技术等为代表的新型培养技术的进一步成熟以及高通量测序的迅猛发展，越来越多的微生物被发现，特别是一些难培养微生物或微生物新种被成功地分离培养，但截至目前绝大部分微生物还是无法培养出来。究其原因，制约大部分微生物无法培养的原因有 2 个方面：(1) 设备昂贵、操作复杂及技术要求高等因素导致原位培养、微流控培养技术、细胞分选技术等新型培养方法还无法广泛应用；(2) 对环境微生物生长所必需的关键营养因子或信号分子的种类、VBNC 微生物的复苏过程及机制、微生物互作机制、代谢途径及调控机制等的认识十分匮乏。

针对目前的研究状况，我们认为可从以下研究方向着手：(1) 针对成功分离到的难培养微生物，从生理特点、代谢途径及营养需求等方面探索微生物可培养机理，破解其可培养的密码，为后续其他难培养微生物奠定理论基础; (2) 传统培养法+新型培养法、培养法+多组学技术等方法的结合，取长补短。比如，将原位培养与共培养或者膜技术结合，既可以模拟自然生长环境，又考虑了微生物与微生物之间的相互作用。目前，培养组学[89]主要应用于培养和鉴定人类肠道微生物，未来可将该技术应用于环境微生物的分离培养；其次，多组学技术能够深入挖掘功能基因及微生物、揭示重要代谢途径，发现关键蛋白(酶)或代谢物，从分子层面探究微生物代谢途径和生理生化机制，以期寻找对难培养微生物生长起关键作用的营养物质以及培养条件。(3) 研究群体感应(Quorum Sensing，QS)与复苏促进因子之间的关系，从微生物互作的角度揭示 VBNC 复苏机制。

REFERENCES

[1] Locey KJ, Lennon JT. Scaling laws predict global microbial diversity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(21): 5970-5975

[2] Solden L, Lloyd K, Wrighton K. The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority[J]. Current Opinion in Microbiology, 2016, 31: 217-226

[3] Gutleben J, De Mares MC, Van Elsas JD, Smidt H, Overmann J, Sipkema D. The multi-omics promise in context: from sequence to microbial isolate[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2018, 44(2): 212-229

[4] Zhang S, Ding LX, Su XM. Formation and resuscitation of the viable but non-culturable state in microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(8): 1331-1339 (in Chinese)
张硕, 丁林贤, 苏晓梅. 微生物 VBNC 状态形成及复苏机制[J]. 微生物学报, 2018, 58(8): 1331-1339

[5] Lewis WH, Tahon G, Geesink P, Sousa DZ, Ettema TJG. Innovations to culturing the uncultured microbial majority[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(4): 225-240

[6] Vartoukian SR. Cultivation strategies for growth of uncultivated bacteria[J]. Journal of Oral Biosciences, 2016, 58(4): 143-149

[7] Zhou N, Jiang CY, Liu SJ. Cultivation of microorganisms from environments: nutrient level of the culture medium is of great importance[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 1075-1081 (in Chinese)
周楠, 姜成英, 刘双江. 从环境中分离培养微生物: 培养基营养水平至关重要[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 1075-1081

[8] Cavicchioli R, Ostrowski M, Fegatella F, Goodchild A, Guixa-Boixereu N. Life under nutrient limitation in oligotrophic marine environments: an eco/physiological perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (formerly *Sphingomonas alaskensis*)[J]. Microbial Ecology, 2003, 45(3): 203-217

[9] Zhang XH. Marine Microbiology[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2007: 332-333 (in Chinese)
张晓华. 海洋微生物学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007: 332-333

[10] Zhang XH, Ahmad W, Zhu XY, Chen JX, Austin B. Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms[J]. Marine Life Science & Technology, 2021, 3(2): 189-203

[11] Zhang ZY, Ding LJ, He S. Research progress on *in situ* cultivation of uncultured microorganisms[J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(5): 907-913 (in Chinese)
张作艳, 丁立建, 何山. 未培养微生物原位培养技术研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(5): 907-913

[12] Tian T, Li DM, Dai SK, Yin KD, Sun HM, Li X. Culture methods of the oligotrophic marine microbes[J]. Microbiology China, 2009, 36(7): 1031-1039 (in Chinese)
田甜, 李冬梅, 戴世鲲, 殷克东, 孙慧敏, 李翔. 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

[13] Li DN, Huang W, Wang XD, Luo XY, Qiu SY. Identification and flavor profile of a thermoactinomycetaceae strain separated from moutai-flavor *Daqu*[J]. Food Science, 2018, 39(6): 171-176 (in Chinese)
李豆南, 黄魏, 王晓丹, 罗小叶, 邱树毅. 酱香型大曲中高温放线菌的筛选及风味成分分析[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 171-176

[14] Nguyen TM, Seo C, Ji M, Paik MJ, Myung SW, Kim J. Effective soil extraction method for cultivating previously uncultured soil bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(24): e01145-18

[15] Xian WD, Salam N, Li MM, Zhou EM, Yin YR, Liu ZT, Ming YZ, Zhang XT, Wu G, Liu L, et al. Network-directed efficient isolation of previously uncultivated *Chloroflexi* and related bacteria in hot spring microbial mats[J]. npj Biofilms and Microbiomes, 2020, 6(1): 20

[16] Bruns A, Cypionka H, Overmann J. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3978-3987

[17] Bruns A, Nübel U, Cypionka H, Overmann J. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 1980-1989

[18] Hirakawa H, Tomita H. A new class of acyl-homoserine lactone quorum sensing signals[J]. Nippon Saikingaku Zasshi, 2013, 68(4): 325-335

[19] Guan LL, Onuki H, Kamino K. Bacterial growth stimulation with exogenous siderophore and synthetic *N*-acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 2797-2803

[20] Sorokin DY, Messina E, Smedile F, Roman P, Damsté JSS, Ciordia S, Mena MC, Ferrer M, Golyshin PN, Kublanov IV, et al. Discovery of anaerobic lithoheterotrophic haloarchaea, ubiquitous in hypersaline habitats[J]. The ISME Journal, 2017, 11(5): 1245-1260

[21] Harbison AB, Price LE, Flythe MD, Bräuer SL. *Micropepsis pineolensis* gen. nov., sp. nov., a mildly acidophilic alphaproteobacterium isolated from a poor fen, and proposal of *Micropepsaceae* fam. nov. within *Micropepsales* ord. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(4): 839-844

[22] Kim S, Kang I, Seo JH, Cho JC. Culturing the ubiquitous freshwater actinobacterial acI lineage by supplying a

biochemical 'helper' catalase[J]. The ISME Journal, 2019, 13(9): 2252-2263

[23] Zeng JM, Zeng ZS, Yuan HJ, Tan ZY. Advances in culture methods of oligotrophic microbes[J]. Current Biotechnology, 2012, 2(3): 165-170 (in Chinese)
曾建民, 曾振顺, 原红娟, 谭志远. 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

[24] Zhang XH, Zhong HH, Chen JX. Research progress on viable but nonculturable state bacteria[J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(9): 153-160 (in Chinese)
张晓华, 钟浩辉, 陈吉祥. 细菌活的非可培养状态研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 2020, 50(9): 153-160

[25] Yu XY. Isolation and phylogenetic studies of viable but non-culturable bacteria from Xinjiang soil samples[D]. Jinhua: Master's Thesis of Zhejiang Normal University, 2015 (in Chinese)
余晓云. 新疆土壤 VBNC 状态菌的复苏可培养化及其系统发育关系研究[D]. 金华: 浙江师范大学硕士学位论文, 2015

[26] Zhai JY. Excavation and phylogenetic studies of un-cultivated microbial resources in environment[D]. Jinhua: Master's Thesis of Zhejiang Normal University, 2017 (in Chinese)
翟竟余. 环境未培养微生物资源的发掘与系统分类学研究[D]. 金华: 浙江师范大学硕士学位论文, 2017

[27] Stott MB, Crowe MA, Mountain BW, Smirnova AV, Hou SB, Alam M, Dunfield PF. Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(8): 2030-2041

[28] Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, Nakamura K, Nomura N, Matsumura M, Kamagata Y. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 2162-2169

[29] Tamaki H, Hanada S, Sekiguchi Y, Tanaka Y, Kamagata Y. Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(7): 1827-1834

[30] Tanaka T, Kawasaki K, Daimon S, Kitagawa W, Yamamoto K, Tamaki H, Tanaka M, Nakatsu CH, Kamagata Y. A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7659-7666

[31] Kato S, Yamagishi A, Daimon S, Kawasaki K, Tamaki H, Kitagawa W, Abe A, Tanaka M, Sone T, Asano K, et al. Isolation of previously uncultured slow-growing bacteria by using a simple modification in the preparation of agar media[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(19): e00807-18

[32] Zheng J, Feng JQ, Zhou L, Mbadinga SM, Gu JD, Mu BZ. Characterization of bacterial composition and diversity in a long-term petroleum contaminated soil and isolation of high-efficiency alkane-degrading strains using an improved medium[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(2): 34

[33] Adam D, Maciejewska M, Naômé A, Martinet L, Coppieters W, Karim L, Baurain D, Rigali S. Isolation, characterization, and antibacterial activity of hard-to-culture actinobacteria from cave moonmilk deposits[J]. Antibiotics (Basel), 2018, 7(2): 28

[34] Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Giovannoni SJ. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade[J]. Nature, 2002, 418(6898): 630-633

[35] Choi EJ, Beatty DS, Paul LA, Fenical W, Jensen PR. *Mooreia alkaloidigena* gen. nov., sp. nov. and *Catalinimonas alkaloidigena* gen. nov., sp. nov., alkaloid-producing marine bacteria in the proposed families *Mooreiaceae* fam. nov. and *Catalimonadaceae* fam. nov. in the phylum *Bacteroidetes*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(Pt 4): 1219-1228

[36] Sun LW, Toyonaga M, Ohashi A, Matsuura N, Tourlousse DN, Meng XY, Tamaki H, Hanada S, Cruz R, Yamaguchi T, et al. Isolation and characterization of *Flexilinea flocculi* gen. nov., sp. nov., a filamentous, anaerobic bacterium belonging to the class *Anaerolineae* in the phylum *Chloroflexi*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(2): 988-996

[37] Pulschen AA, Bendia AG, Fricker AD, Pellizari VH, Galante D, Rodrigues F. Isolation of uncultured bacteria from Antarctica using long incubation periods and low nutritional media[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1346

[38] He RH. Bacterial diversity analysis of Arctic and Antarctic environmental samples, screening of pathogen-antagonistic bacteria and identification of novel species[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2019 (in Chinese)
贺瑞含. 南北极环境样品微生物多样性分析、病原拮抗菌筛选及新物种的鉴定[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2019

[39] Colin Y, Goñi-Urriza M, Caumette P, Guyoneaud R. Contribution of enrichments and resampling for sulfate reducing bacteria diversity assessment by high-throughput cultivation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 110: 92-97

[40] Henson MW, Lanclos VC, Pitre DM, Weckhorst JL, Lucchesi AM, Cheng CK, Temperton B, Thrash JC. Expanding the diversity of bacterioplankton isolates and modeling isolation efficacy with large scale dilution-to-extinction cultivation[J]. Applied and

Environmental Microbiology, 2020, 86(17): e00943-20

[41] Stingl U, Tripp HJ, Giovannoni SJ. Improvements of high-throughput culturing yielded novel SAR11 strains and other abundant marine bacteria from the Oregon coast and the Bermuda Atlantic Time Series study site[J]. The ISME Journal, 2007, 1(4): 361-371

[42] Jimenez-Infante F, Ngugi DK, Vinu M, Blom J, Alam I, Bajic VB, Stingl U. Genomic characterization of two novel SAR11 isolates from the Red Sea, including the first strain of the SAR11 Ib clade[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2017, 93(7): fix083

[43] Bartelme RP, Custer JM, Dupont CL, Espinoza JL, Torralba M, Khalili B, Carini P. Influence of substrate concentration on the culturability of heterotrophic soil microbes isolated by high-throughput dilution-to-extinction cultivation[J]. mSphere, 2020, 5(1): e00024-20

[44] Xing L, Zhao SG, Zheng N, Li SL, Wang JQ. Advance in isolation and culture techniques of uncultured microbes: a review[J]. Microbiology China, 2017, 44(12): 3053-3066 (in Chinese)
邢磊, 赵圣国, 郑楠, 李松励, 王加启. 未培养微生物分离培养技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(12): 3053-3066

[45] Ratzke C, Gore J. Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions[J]. PLoS Biology, 2018, 16(3): e2004248

[46] Jiang LJ, Liu XW, Dong CM, Huang ZB, Cambon-Bonavita MA, Alain K, Gu L, Wang SS, Shao ZZ. "*Candidatus* Desulfobulbus rimicarensis," an uncultivated deltaproteobacterial epibiont from the deep-sea hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(8): e02549-19

[47] Nichols D, Lewis K, Orjala J, Mo S, Ortenberg R, O'Connor P, Zhao C, Vouros P, Kaeberlein T, Epstein SS. Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow *in vitro*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4889-4897

[48] Park BJ, Park SJ, Yoon DN, Schouten S, Sinninghe Damsté JS, Rhee SK. Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in coculture with sulfur-oxidizing bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(22): 7575-7587

[49] D'Onofrio A, Crawford JM, Stewart EJ, Witt K, Gavrish E, Epstein S, Clardy J, Lewis K. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria[J]. Chemistry & Biology, 2010, 17(3): 254-264

[50] Ma LY, Calfee BC, Morris JJ, Johnson ZI, Zinser ER. Degradation of hydrogen peroxide at the ocean's surface: the influence of the microbial community on the realized thermal niche of *Prochlorococcus*[J]. The ISME Journal, 2018, 12(2): 473-484

[51] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable"

[52] microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. Science, 2002, 296(5570): 1127-1129

[52] Bhuiyan MNI, Takai R, Mitsuhashi S, Shigetomi K, Tanaka Y, Kamagata Y, Ubukata M. Zincmethylphyrins and coproporphyrins, novel growth factors released by *Sphingopyxis* sp., enable laboratory cultivation of previously uncultured *Leucobacter* sp. through interspecies mutualism[J]. The Journal of Antibiotics, 2016, 69(2): 97-103

[53] Wu JF. Research of marine microbial community characteristics and high-throughput cultivating based on microencapsulation[D]. Beijing: Master's Thesis of Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2014 (in Chinese)
吴家法. 基于微包埋技术的海洋原核微生物群体特征及高通量培养研究[D]. 北京: 中科院研究生院硕士学位论文, 2014

[54] 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

[55] Ferrari BC, Gillings MR. Cultivation of fastidious bacteria by viability staining and micromanipulation in a soil substrate membrane system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(10): 3352-3354

[56] Aoi Y, Kinoshita T, Hata T, Ohta H, Obokata H, Tsuneda S. Hollow-fiber membrane chamber as a device for *in situ* environmental cultivation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3826-3833

[57] Bollmann A, Palumbo AV, Lewis K, Epstein SS. Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(22): 7413-7419

[58] Steinert G, Whitfield S, Taylor MW, Thoms C, Schupp PJ. Application of diffusion growth chambers for the cultivation of marine sponge-associated bacteria[J]. Marine Biotechnology, 2014, 16(5): 594-603

[59] Jiang MG, Gan GH, Yang LF, Li XN, Yang GL, Tuo L, Sun CH, Huang L, Lan JZ. *In situ* isolation of actinomycetes and screening bioactive potential from mangrove rhizosphere soils in Guangxi[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2015, 37(2): 55-64 (in Chinese)
姜明国, 甘光华, 杨立芳, 李西妮, 杨桂柳, 庹利, 孙承航, 黄玲, 蓝金枝. 广西红树林根际土壤放线菌的原位培养分离及其活性筛选[J]. 海洋学报, 2015, 37(2): 55-64

[60] Remenár M, Karelová E, Harichová J, Zámocký M, Kamlárová A, Ferianc P. Isolation of previously uncultivable bacteria from a nickel contaminated soil using a diffusion-chamber-based approach[J]. Applied Soil Ecology, 2015, 95: 115-127

[61] Chaudhary DK, Khulan A, Kim J. Development of a novel

cultivation technique for uncultured soil bacteria[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 6666

[62] Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, Pham L, Mehta A, Belanger A, Kanigan T, Lewis K, Epstein SS. Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable" microbial species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(8): 2445-2450

[63] Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, Mueller A, Schäberle TF, Hughes DE, Epstein S, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance[J]. Nature, 2015, 517(7535): 455-459

[64] Alessi AM, Redeker KR, Chong JPJ. A practical introduction to microbial molecular ecology through the use of isolation chips[J]. Ecology and Evolution, 2018, 8(24): 12286-12298

[65] Gavrish E, Bollmann A, Epstein S, Lewis K. A trap for *in situ* cultivation of filamentous actinobacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 72(3): 257-262

[66] Jung DW, Ahn TS. Filter plate micro trap as a device for *in situ* cultivation for environmental microorganisms[J]. Journal of Life Science, 2012, 22(6): 723-729

[67] Jung D, Seo EY, Owen JS, Aoi Y, Yong S, Lavrentyeva EV, Ahn TS. Application of the filter plate microbial trap (FPMT), for cultivating thermophilic bacteria from thermal springs in Barguzin area, eastern Baikal, Russia[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2018, 82(9): 1624-1632

[68] Jung D, Seo EY, Epstein SS, Joung Y, Han J, Parfenova VV, Belykh OI, Gladkikh AS, Ahn TS. 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

[69] Zengler K, Toledo G, Rappé M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM, Keller M. Cultivating the uncultured[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(24): 15681-15686

[70] 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

[71] Gao XZ. The establishment and application of micro-entrapment cultivation in isolation of myxobacteria[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2010 (in Chinese)
高秀珍. 微包埋培养技术的建立及其在粘细菌分离纯化中的应用[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2010

[72] Song LB, Zhao H. Screening of a functional bacterial strain from Chinese liquor pit mud by microencapsulation culture method[J]. Food Science, 2017, 38(6): 153-159 (in Chinese)
宋连宝, 赵辉. 包埋培养法筛选白酒窖泥中一株功能细菌[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 153-159

[73] Epstein SS. Uncultivated Microorganisms[M]. Jinan: Shandong University Press, 2010: 29-30 (in Chinese)
斯拉瓦·S·爱泼斯坦. 未培养微生物[M]. 济南: 山东大学出版社, 2010: 29-30

[74] Yuan Y, He S. Selective isolations of marine rare actinomycetes[J]. Journal of Ningbo University (NSEE), 2014, 27(3): 12-17 (in Chinese)
原野, 何山. 海洋稀有放线菌的选择性分离方法[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2014, 27(3): 12-17

[75] Lewis K, Epstein S, D'Onofrio A, Ling LL. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites[J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63(8): 468-476

[76] Berdy B, Spoering AL, Ling LL, Epstein SS. *In situ* cultivation of previously uncultivable microorganisms using the ichip[J]. Nature Protocols, 2017, 12(10): 2232-2242

[77] Chen L, Bi HY, Wang WY, Wang GY. Novel approaches for isolation and cultivation of microorganisms associated with marine animals[J]. Microbiology China, 2018, 45(9): 2035-2042 (in Chinese)
陈雷, 毕洪玉, 王婉莹, 王光玉. 海洋动物来源微生物分离培养的新方法[J]. 微生物学通报, 2018, 45(9): 2035-2042

[78] Ji SQ, Liu CG, Zhang XH. The progress and applications of microencapsulation and cultivation of marine microorganisms[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(4): 53-59 (in Chinese)
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, 2010, 40(4): 53-59

[79] Wang C. Preliminary application of sandwich plate technology in marine bacterial resources research and polyphasic taxonomy analysis of three novel bacterial strains[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2019 (in Chinese)
王冲. 夹心平板技术在海洋细菌资源挖掘中的初步应用及三株新菌的分类鉴定[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2019

[80] Fan NS, Qi R, Yang M. Current technical progresses in the cultivation for uncultured microorganism[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2016, 22(3): 524-530 (in Chinese)
范念斯, 齐嵘, 杨敏. 未培养微生物的培养方法进展[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(3): 524-530

[81] Burmeister A, Grünberger A. Microfluidic cultivation and analysis tools for interaction studies of microbial co-cultures[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 62: 106-115

[82] Najah M, Calbrix R, Mahendra-Wijaya IP, Beneyton T, Griffiths AD, Drevelle A. Droplet-based microfluidics platform for ultra-high-throughput bioprospecting of cellulolytic microorganisms[J]. Chemistry & Biology, 2014, 21(12): 1722-1732

[83] Jiang CY, Dong LB, Zhao JK, Hu XF, Shen CH, Qiao YX, Zhang XY, Wang YP, Ismagilov RF, Liu SJ, et al. High-throughput single-cell cultivation on microfluidic streak plates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(7): 2210-2218

[84] Zhao YT, Hun TT, Zhan YW, Fan TW, Zhao F, Chao YP, Sun Y. Single cell capture and culture of fungi based on microfluidic[J]. Microbiology China, 2019, 46(3): 522-530 (in Chinese)
赵莹彤, 浑婷婷, 詹悦维, 范婷文, 赵峰, 钞亚鹏, 孙艳. 基于微流控的真菌单细胞捕获和培养[J]. 微生物学通报, 2019, 46(3): 522-530

[85] Irie K, Fujitani H, Tsuneda S. Physical enrichment of uncultured *Accumulibacter* and *Nitrospira* from activated sludge by unlabeled cell sorting technique[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 122(4): 475-481

[86] Abe T, Ushiki N, Fujitani H, Tsuneda S. A rapid collection of yet unknown ammonia oxidizers in pure culture from activated sludge[J]. Water Research, 2017, 108: 169-178

[87] Fujitani H, Ushiki N, Tsuneda S, Aoi Y. Isolation of sublineage I *Nitrospira* by a novel cultivation strategy[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(10): 3030-3040

[88] Fujitani H, Kumagai A, Ushiki N, Momiuchi K, Tsuneda S. Selective isolation of ammonia-oxidizing bacteria from autotrophic nitrifying granules by applying cell-sorting and sub-culturing of microcolonies[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1159

[89] Lagier JC, Dubourg G, Million M, Cadoret F, Bilen M, Fenollar F, Levasseur A, Rolain JM, Fournier PE, Raoult D. Culturing the human microbiota and culturomics[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16: 540-550