

未/难培养微生物可培养策略研究：机遇与挑战

李斌斌^{1,2}, 吴丹妮¹, 聂国兴², 周宇光¹, 蔡曼^{*1}, 李文均^{*2,3}

1 中国科学院微生物研究所 中国普通微生物菌种保藏管理中心, 北京 100101

2 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007

3 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

李斌斌, 吴丹妮, 聂国兴, 周宇光, 蔡曼, 李文均. 未/难培养微生物可培养策略研究：机遇与挑战[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 832-844.

LI Binbin, WU Danni, NIE Guoxing, ZHOU Yuguang, CAI Man, LI Wenjun. Isolation and culture techniques of uncultured microorganisms: challenges and opportunities[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 832-844.

摘要：微生物分布广泛、种类繁多、功能多样，虽体积微小但功能强大，关乎人类的安全健康和生态的稳定发展，在整个地球生命系统中起着举足轻重的作用。17 世纪以来，研究者们一直努力获得、了解和利用这些微生物，然而目前分离方法的局限性使得环境中绝大部分微生物仍不能被纯培养，严重阻碍了我们对微生物生命活动规律的认知。因此，如何分离获得这些仍未被培养出来的“暗物质”是微生物研究面临的严峻挑战和重大机遇。本文分析了环境中制约微生物分离培养的因素，综述未/难培养微生物可培养研究的最新进展，着重论述优化的传统培养方法及网络导向培养、膜扩散培养、微流控分选培养和细胞分选培养等新型技术的应用，并对未来研究进行展望，探索多技术联合使用策略，为未/难微生物资源的挖掘及开发利用提供借鉴。

关键词：未/难培养微生物；分离培养方法；培养技术，微生物“暗物质”

Isolation and culture techniques of uncultured microorganisms: challenges and opportunities

LI Binbin^{1,2}, WU Danni¹, NIE Guoxing², ZHOU Yuguang¹, CAI Man^{*1}, LI Wenjun^{*2,3}

1 China General Microbiological Culture Collection Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China

3 School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, Guangdong, China

Abstract: Microorganisms are ubiquitous on the earth, with high diversity and a variety of

资助项目：国家自然科学基金(32170101)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170101).

*Corresponding authors. E-mail: CAI Man, caiman@im.ac.cn; LI Wenjun, liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

Received: 2022-09-01; Accepted: 2022-12-12; Published online: 2023-01-04

functions. They play an irreplaceable role in human health, ecological stability, and species evolution. Despite the endeavor in the isolation, research, and utilization of microorganisms since the 17th century, most microorganisms cannot be obtained by the pure culture method, which has seriously hindered the research on microbial life activities and the development of microbial resources. The acquisition of the “dark matter” has always been a serious challenge. However, it is also an opportunity to break this shackle and obtain more microbial resources. This review introduces the influencing factors that restrict the isolation and incubation of microorganisms in the environments, describes the new culture techniques such as optimization of traditional culture strategy, co-occurrence network-based culture, membrane diffusion-based culture, microfluidics, and cell sorting, and puts forward the strategy of combining multiple techniques, with a view to providing reference for the development and utilization of microbial resources.

Keywords: uncultured microorganisms; isolation and culture method; culture technique; microbial “dark matter”

微生物是地球上生物量最大和多样性最丰富的生命形式, 细胞总量高达 10^{30} , 是地球生物圈的重要组成部分^[1], 广泛分布于各种生境, 在热泉、沙漠、洞穴、冰川、火山口等极端环境中都有其存在, 微生物也是进化历史最悠久的生命形式^[2], 参与各种关键的物质循环和能量流动, 在地球生态系统中占据着重要的生态位, 对人类社会的发展有着不可估量的双面效应。

150 年前, 人类首批“微生物猎人”通过琼脂平板分离法对“杂居混生”的微生物进行了纯种分离, 获得了纯种菌落, 开启了对微生物生理、生化及分子水平的认识^[3], 然而百年后的今天, 我们仍然主要依靠固体分离培养的方法获得纯培养菌株, 已获得的菌株仅仅约占微生物物种总量的 0.1%–1.0%。自然界还有大量未培养、难培养的微生物资源, 它们被称为微生物世界的“暗物质”(microorganism dark matter, MDM)。20 世纪末, 人类基因测序技术飞速发展, 公共数据库中的微生物基因组数据迅速积累, 为“暗物质”的探索 and 发现提供了强有力的技术支撑^[4]。其中, 作为衡量进化“金标尺”的 16S rRNA 基

因数据也越来越多, 目前基于 16S rRNA 基因序列已探测到的细菌和古菌总量约 40 万种, 分属于 6 万个属^[5], 但其中已获得纯培养且有效发表的物种仅有 14 000 余种, 分布于 38 个门和 3 500 个属^[6-7], 大部分为拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门和变形菌门菌种^[8]。由此可见, 人类探测到的细菌和古菌绝大部分仍处于未培养状态, 还有待我们去挖掘。伴随着生物信息学技术, 如聚合酶链式反应、荧光原位杂交技术、实时荧光定量 PCR 和高通量测序等的蓬勃发展, 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, 但这些先进的信息和分子技术仍不能替代纯培养技术获得实物菌株。

为了更准确、更全面、更深入地认识、理解和利用环境中的微生物, 获取其纯培养菌株仍然是关键, 而是否能找到合适的分离培养策略方法, 在一定程度上决定了是否能获得未/难培养目标菌株^[3]。在百余年的微生物学发展长河中, 传统分离培养方法发挥着不可替代的作用。其主要基于微生物的生理、表型及功能特征来进行分离, 包括: (1) 选择不同的营养物质

作为分离培养基；(2) 设置不同的物理化学条件，如温度、pH、盐度等；(3) 添加选择性抑制剂或生长因子，如抗生素、氨基酸、有毒化合物等；(4) 根据目标微生物的大小、趋光性和运动性等特性进行筛选；(5) 对环境样品进行梯度稀释后分离等^[8]。这些传统的分离培养策略和方法帮助我们从中得到了大量不同种类的微生物资源，为我们更好地理解微生物及其多样性提供了保障，但局限性也非常明显，使得未/难培养微生物的获得几率相对较小。传统的分离方法大多从菌株本身对环境的需求出发，忽略了群落的存在，忽视了目标菌株在群落中与其他多方菌株的相互作用，如互生、共生、拮抗等，因此，抛开菌种间的相互作用仅考虑模拟环境因子或菌株碳氮源需求等单一因素，势必会影响到大量受相互作用影响的未/难培养微生物资源的获得。

本文分析影响微生物可培养性的可能限制因子，介绍传统培养策略的改进措施如寡营养分离、添加抑制剂、维生素和信号分子等，陈述新型培养技术如膜扩散法、细胞分选技术和微流控技术等原理、特点及优缺点，汇总分离培养方法的最新研究成果，总结目前细菌、古菌资源纯培养研究遇到的瓶颈问题并探索解决策略，最后展望未来，迎接未/难培养微生物研究的机遇与挑战，以期为今后微生物“暗物质”的挖掘和利用提供理论指导和技术支撑。

1 未/难培养微生物可培养性的限制因素

1.1 实验室无法模拟微生物生长的原生自然环境

自然环境复杂多变，目前人类对微生物生

长环境的了解无法穷尽，因此，实验室不能完全模拟微生物生长的原生生态环境。由于难以全面了解目的微生物的自然栖息环境，使得某些生长必需营养元素以及生物小分子信号物质在分离培养基中得不到补充，在实验室不能提供微生物生长的理想条件，从而导致目的微生物的分离培养失败^[9]。此外，微生物生存的自然环境类型也是多种多样的。有适宜于人类生存的普通环境，也存在着各种极端环境，如高/低温、高/低盐、高/低碱、缺氧、黑暗的海底热液口、南北极冰川、冻土、盐碱地和洞穴等极端环境。尽管人们已经极力去检测极端环境的各种指标，并从中分离培养出一些微生物种群，但基于目前实验条件和设备制造的局限性，仍不能完全模拟自然环境中微生物生长的物理化学条件，因此，研究者们通常化繁为简，仅抓住重点关注的主要环境因子设计分离培养方法^[10]，从而在获得某些类群的同时也丢失了大部分可能需要多种极端生长条件的未/难培养微生物类群^[11]。

1.2 休眠体的存在与复苏

休眠是生物的生命活动之一，是包括微生物在内的广泛生物类群使用的一种生存策略，是指生物体在面临不利环境条件时进入可逆的低代谢活动状态^[12]。在营养和能量可用性较低的情况下，微生物的细胞不分裂且处于可持续存在的休眠状态。在深地生物圈中，休眠被推测是原核生物的默认状态^[13]。地球上大部分的未/难培养微生物正是以休眠体的形式存在，它们处于一种可存活但难以培养(viable but non-culturable, VBNC)的状态^[14]。目前已有学者研究微生物的休眠机制，并提出不同类群可能进化出不同的休眠调节机制，且休眠的复苏是一个随机过程^[15]。但总体而言，我们现在对于不同物种的休眠和复苏机制仍然研究得不够

透彻, 深层原理知之甚少^[8], 无法高效地使用适宜的方法促进不同微生物休眠体的复苏, 因此也限制了未/难培养微生物的分离获得^[16]。如何解决这一难题, 突破瓶颈, 正是现在研究者面临的重大机遇和挑战。

1.3 微生物的低丰度与慢生长

随着组学技术的飞速发展, 研究者发现, 在复杂的自然群落中存在许多丰度低但代谢功能强的微生物。然而, 鉴于目前研究者仍无法准确判定这些低丰度微生物类群的适宜生长方式, 导致无法对低丰度类群进行有效富集^[9], 从而无法获得这些低丰度类群的纯培养菌株。同时, 自然环境中也存在一些生长速率相对较慢的类群, 在一定的分离培养条件下, 生长速率快的类群大量繁殖, 占据了较多的生长资源和生存空间, 从而抑制了慢生长类群的繁殖, 使得传统分离培养方法很难将慢生长类群筛选出来。从选择压的角度考虑, 在一定的分离培养条件下, 能高效利用培养基底物的微生物会快速生长成为优势类群, 而不适应底物的慢生长类群同样会因被强占了生长资源和生长空间而形成处于极低生物量的状态, 难以分离获得。另外, 也有一些寡营养或慢生长的微生物类群, 即使在无快生长类群的抑制下, 也仅仅在分离培养基上形成超微型菌落, 而这些超微型菌落又往往因为培养时间不够或检测技术不灵敏而被忽略掉, 表现为“未/难培养”微生物^[10,17]。

1.4 群落成员间的相互作用

微生物种类多样, 包括原核的细菌、放线菌、蓝细菌、支原体、立克次氏体和衣原体, 真核的真菌、原生动物和显微藻类, 以及非细胞的病毒和亚病毒。它们不是孤立存在的, 而是处于复杂的生态相互作用网络中^[18]。因此, 这些微生物群落中的复杂隐秘关系影响着微生物的分离培养, 这些彼此间的联系, 包括寄生、互

生、共生、竞争和拮抗等^[19-20]。共生是共居在一起的微生物类群相互分工合作、相依为命, 甲的生长需要乙所分泌的营养物质或电子供体, 如氨基酸、碱基或维生素等^[21]。互生是可分可合, 合比分好; 同时, 一些小分子物质或电子供体(如 H_2 和甲酸盐等)可直接在群落成员之间进行交换^[22]。而竞争和拮抗则是指利甲而损乙或是损甲又损乙的相互关系。生物膜就是这种复杂群落关系的一个实例, 自然界中有相当数量的细菌是以生物膜的形式存在, 它们有组织地聚集生长, 形成附着于有生命或无生命物体表面的多细胞结构, 也是一个小的生态系统, 广泛分布于各种生境之中^[23-24]。构成生物膜的不同类群微生物之间就有着密切的共生合作关系, 这使得他们有更强的抗逆性, 可以更好地应对极端环境压力。也正是因为这些复杂的相互关系, 研究者们目前尚无足够的办法模拟群落间的各种影响, 也未能将生物膜中的各种微生物有效分离^[25]。另外, 由于传统分离培养形式的局限性使得可运用的分离条件较为单一, 不能同时实现目标物种在自然群落中所处的多种相互关系, 因此无法有效分离。

微生物在自然群落中的相互关系是复杂多样的, 研究者目前还无法实现多方位模拟, 这也是导致大量未/难培养微生物存在的原因。

1.5 营养环境的剧烈变化

现存的任何有机体都是长期自然适应和进化的结果。一些微生物选择了快速生长、存活率低、仰赖高繁殖率的 r 生长策略; 另一些则选择了适应低营养含量, 对环境资源亲和性高, 但生长率极低的 K 策略^[26]。当进行分离培养时, 突然的纯培养环境、极度营养变化突现许多细菌基因型的固有结构缺陷, 甚至可能成为主要生长障碍^[17]。给予高浓度营养物质的分离方法, 适宜于利用、需要或可耐受这些物质的微生物

生长,且通常这些微生物属于快生长类群,但对不耐受或利用较慢的类群就有抑制作用。特别是 *K* 策略者,它们大多数有高效的丙氨酸运输系统^[27],但缺乏对一些关键代谢中间物(如琥珀酸)的运输系统,以此避免代谢物在高度寡营养环境中泄漏,所以对这些微生物提供营养成分丰富的培养基反而成为阻碍其复苏的重要因素^[26]。然而寡营养分离方法虽一般可用于培养生长缓慢的类群,但又对富营养需求的菌种产生了抑制^[9]。因此,将微生物从原始生境中拿出,传统的分离培养方法必然会造成菌种生境营养物质的极度变化,如何破解也是机遇与挑战。

2 微生物可培养策略的创新

2.1 传统培养策略的优化

微生物生长所需的元素不仅仅是碳源氮源等能量物质,某些生物小分子,如氨基酸、维生素、信号分子等也对其生长和繁殖起着至关重要的作用。因此,在分离培养基中添加某些微生物生长所必需的小分子营养物质,可获得或抑制某些特定的微生物类群。抑菌剂的添加即可在排除非目标类群的前提下缓解目标类群的竞争压力,提高目标类群的获得率,从而也可获得更多的未/难培养微生物^[28]。

例如,稀有放线菌的分离,可在分离培养基中添加真菌、革兰氏阴性细菌的抑制剂及放线菌生长促进剂来增加稀有放线菌的获得率。Li 等就针对沙漠放线菌链霉菌属的分离设计了高选择性分离培养策略,通过添加不同浓度的制霉菌素、萘啶酮酸、放线菌酮和重铬酸钾 4 种抑菌剂,抑制了真菌、革兰氏阴性细菌等非目标类群,大大提高了沙漠未培养链霉菌和其他放线菌的获得率,得到包括 48 个链霉菌属潜在新物种的放线菌潜在新物种资源 400 余

株^[29]。该研究为沙漠链霉菌的多样性调查提供了新的见解,也为获得不同环境来源的未/难培养放线菌资源提供了指导。因此,根据不同抑菌剂的原理及作用,通过抑菌剂与分离培养基的合理搭配,可针对性地获得不同的目的类群,提高未/难培养微生物的获得率。

目前,随着测序技术的发展,研究者们也会通过分析微生物基因组在分子层面解析目标物种的生理生化机能,深入挖掘推测其生长繁殖所需的营养物质,从而设计分离培养基,有的放矢地获得更多未/难培养微生物资源^[1,30]。

2.2 共现网络分析导向培养技术

自然界中的微生物并非孤立存在,而是处于一个复杂的生态相互作用网络中。共现分析是指将各种信息载体中的共现信息定量化分析,以揭示信息的内容关联和特征项所隐含的寓意。微生物共现网络(co-occurrence network)分析则可揭示微生物间复杂的相互作用关系,能反映多样性所不能反映的生态联系和生态过程,常用来揭示不同细菌之间或者细菌和功能基因之间的相关性^[31]。基于微生物群落之间的相互作用,Xian 等^[24,28]对云南、西藏热泉菌席的微生物宏基因组进行分析,构建不同菌种的共现性网络,解析群落中的相互作用关系,并分析菌群间的共现网络导向关系,了解微生物之间的复杂相互作用,进行共现性网络分析,并确定了环境中的核心微生物类群;然后针对目标菌群绿弯菌门(*Chloroflexi*)菌种资源的挖掘,寻找其可能的共生类群菌种,将其发酵液引入分离培养基中,在分离筛选阶段实现绿弯菌门菌株的共生需求,从而实现定向分离筛选(图 1)。最终研究成果成功获得大量未/难培养的绿弯菌门菌株,其中潜在新物种达 36 株^[24];同时所用核心菌株的代谢组数据分析也验证了该方法的原理,该菌株发酵液中含

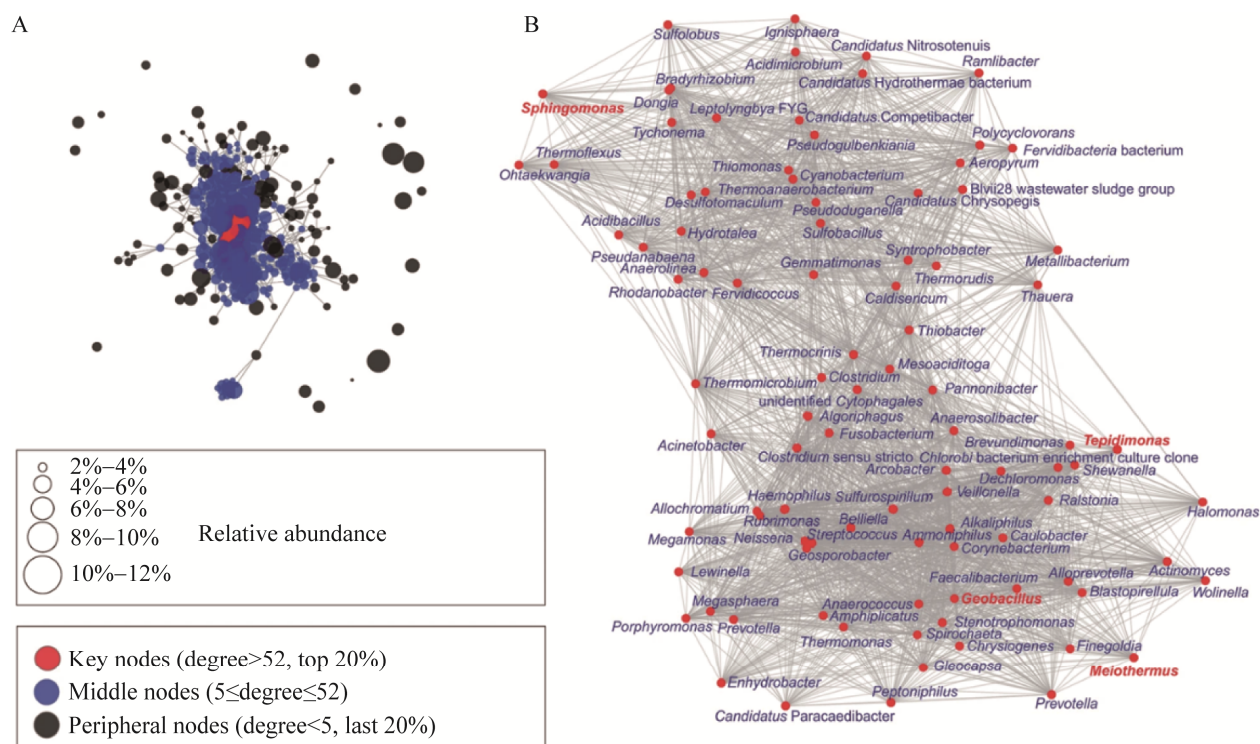


图 1 基于微生物群落高通量测序的共现网络分析^[24] A: 共现网络分析微生物群落中的核心节点. B: 核心节点间的相互作用关系

Figure 1 Co-occurrence networks based on high-throughput sequencing of microorganism communities^[24]. A: Co-occurrence networks analysis of key nodes in microbial communities. B: Interaction of key nodes.

有多种小分子有机质和生物信号分子，是关联细菌生长的潜在重要营养物质，能促进绿弯菌门菌株的生长^[18,32]。因此，利用宏基因组数据，通过共现网络分析可以更精确地找到群落中物种间的相互关系，从而尽可能模拟目标类群的原始生境需求，实现未/难培养微生物的高效靶向分离。

2.3 基于膜扩散的方法

基于目前的检测技术和传统分离培养方法, 我们无法完全检测出自然环境中微生物生长所需的全部营养物质并将其运用于菌种的分离培养, 也无法完全模拟微生物生长的原生生态环境进行分离^[33]。然而近几年, 有研究者运用能使小分子营养物质通过而阻止细胞通过的孔隙微小的通透膜将微生物置于局部原生环境

之中, 使其获得原本的生长状态, 促进未/难培养微生物资源的获得。例如, 中空纤维膜室(hollow-fibre membrane chamber device, HFMC)^[34]、分离芯片(the isolation chip)^[35]、土壤基质膜系统(the soil substrate membrane system, SSMS)^[36]、扩散生物反应器(the diffusion bioreactor)^[37]都是该类基于膜扩散的分离方法(图 2)。

这种培养方法能较大幅度地模拟微生物所处的自然环境, 由于化学物质可以自由穿过薄膜, 环境中的营养物质和代谢产物可透过通透膜扩散到培养基中, 但膜内外的微生物不能相互接触, 从而可使膜内微生物获得其原始生境中所需的所有生长因子, 保证了细胞间的物质交流, 提高了未/难培养微生物可培养性。该方法的优点在于不必分析清楚微生物生长所需的

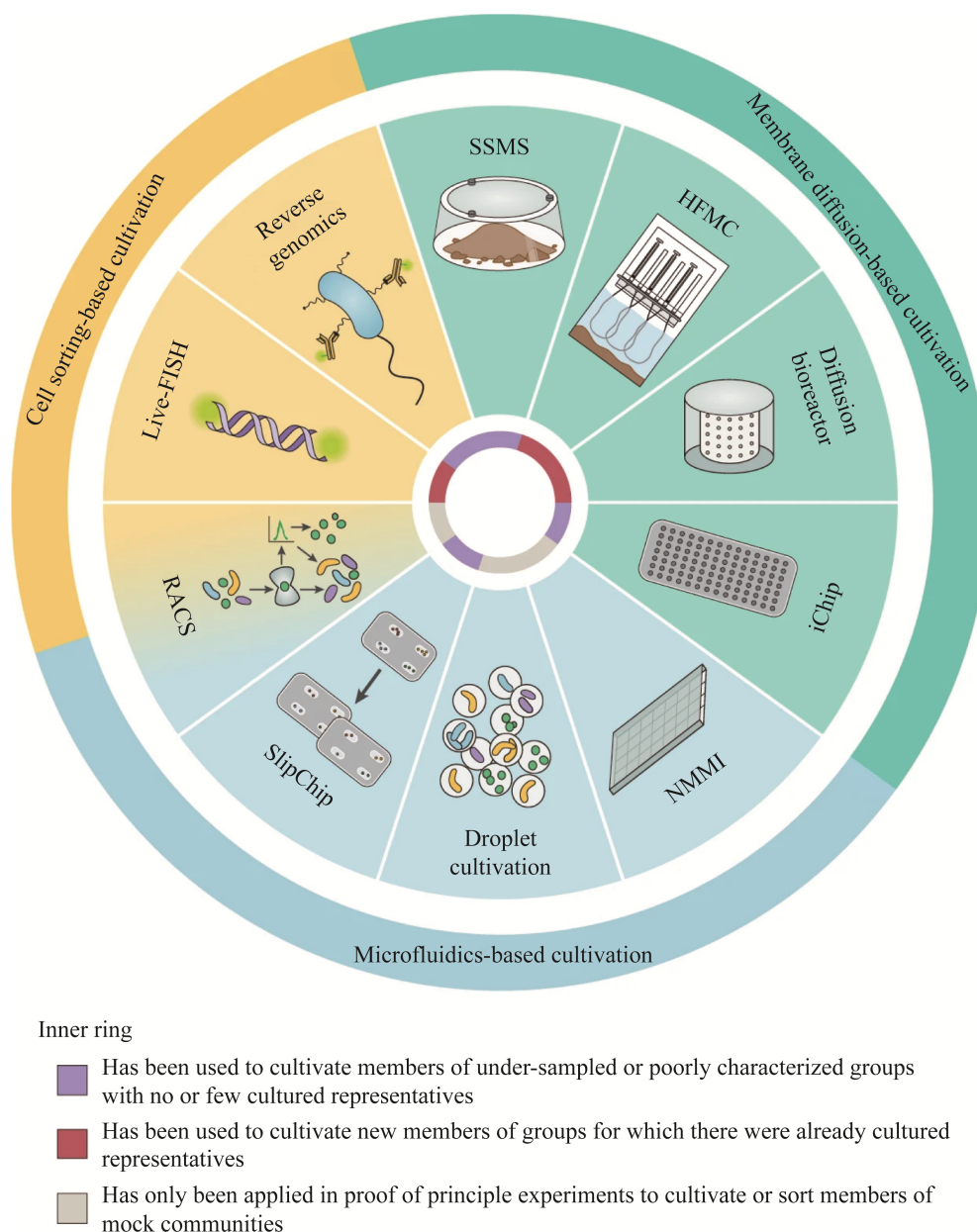


图 2 分离和培养新微生物的创新分离方法^[8] 绿色：基于膜扩散的培养方法，如隔离芯片、中空纤维膜室、扩散生物反应器和土壤基质膜系统；蓝色：微流控技术培养方法，如纳米多孔微生物培养系统、微液滴培养系统和分离芯片；黄色：基于细胞分选的技术，如拉曼激活细胞分选、荧光激活细胞分选和反向基因组学筛选技术

Figure 2 Innovative methods for the isolation and cultivation of novel microorganisms^[8]. Green: Membrane diffusion-based cultivation methods, such as the i (isolation) chip, hollow-fibre membrane chambers (HFMC), diffusion bioreactors or the soil substrate membrane system (SSMS); Blue: Microfluidics-based cultivation methods, such as nanoporous microscale microbial incubators (NMMI) or the SlipChip; Yellow: Cell sorting-based techniques, such as Raman-activated cell sorting (RACS), fluorescence in situ hybridization of live cells (live-FISH) or reverse genomics.

确切营养物质,便可利用膜扩散提供原生环境;但仍存在一些局限性,如对通透膜材质的要求较高、操作较为烦琐^[38]。通过膜内细胞形成的菌落一般较小、肉眼不可见、较难检测和分离、难于进行高通量培养^[9],同时化学物质的自由通过也使得生长抑制物得以接触,这对于分离培养也是个弊端。

2.4 微流控技术

微流控技术(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,其能在短时间内同时检测多种未培养微生物的存在,还可以快速获得目标微生物的纯培养物^[9]。滑动芯片(SlipChips)^[39]、纳米多孔微生物培养系统(nanoporous microscale incubator system, NMMI)^[40]、微液滴培养系统(microfluidics)^[41]等方法都是微流控技术的代表(图 2)。微流控技术在酶资源的高通量筛选、菌株选育、单细胞测序、病原微生物检测等领域都有成功的应用,但其液滴间存在的交叉污染极大地限制了其运用。Hu 等基于传统的液滴注射芯片,提出了新颖的液滴阶梯式注射芯片(stepinjection),该芯片在试剂注射通道出口处设计了一个液滴流动通道突然变宽的阶梯式通道,这一技术使其液滴可控且无交叉污染^[42]。该技术可以实现单细胞的分离培养,从而去除群落中的竞争和拮抗作用,又可实现生长状态的检测,且高通量机械操纵大批量细胞,明显提高了微生物菌种的产出量,如张思琦等采用微流控技术去分选具有抗菌活性的放线菌菌株,通过微流控技术成功验证了其可行性,能够区别于传统的筛选方法,具有提高效率、减少培养周期等优点(图 3)^[43]。

微流控技术能够克服传统纯培养方法的一些弊端,减少了微生物群落间的相互竞争,保

证了丰度低和生长缓慢的微生物的生长。但该技术相关设备是单细胞水平上的研究工具,与传统培养方法相比,制造工艺和操作技术都较为复杂,专业性强、成本较高。

2.5 细胞分选技术

细胞分选技术是许多生物学研究领域的支柱,可用于从混合群落的细胞悬浮液中分离单细胞^[8]。光学钳子(optical tweezers)^[44]、荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)^[45]、荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)^[46]、拉曼激活细胞分选(Raman-activated single-cell sorting, RACS)^[47]和反向基因组学筛选(reverse genomics for targeted isolation)^[48]等方法都是细胞分选技术的代表,常与微流控技术相结合(图 2)。利用这些技术可以对微生物细胞进行靶向分离,特异性地获得标靶微生物,因此也渐渐被运用于未/难培养微生物的分选。Cross 等就利用了细胞分选技术,从人类口腔中分离得到 2 株未/难培养微生物,他们通过分析目标菌株的基因组数据,反向分析,研究获得目标微生物的结合抗体,将其运用于环境样品中,使其与目标微生物作用,然后通过荧光激活细胞分选技术分离得到目标微生物(图 4)^[48]。这些方法可以精确地分离单个细胞,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,但产出量较低,且该方法建立的时间较短,技术还不够成熟,还需继续探索。

3 总结与展望

人类目前能够实现纯培养的微生物不及环境中微生物总量的 1%,随着测序技术的飞速发展和应用,大量未培养微生物的基因组信息被挖掘,但是分离培养方法仍未出现飞跃。

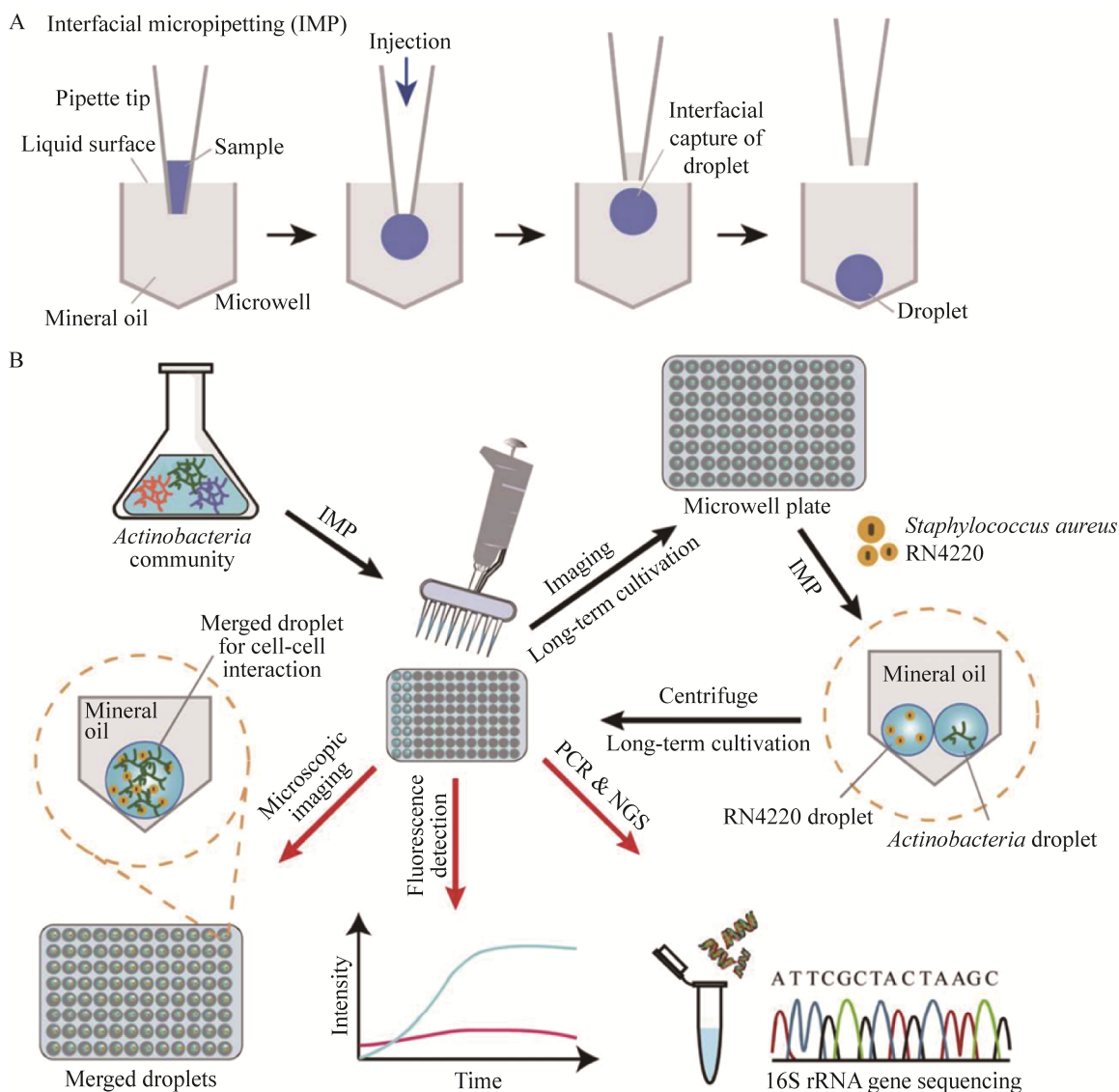


图3 抗菌活性放线菌的微滴移液交互分离筛选方法工作原理及流程示意图^[43] A: 界面微滴加液技术(IMP)示意图. B: 基于互作的抗性放线菌筛选流程

Figure 3 Isolating and screening for antimicrobial *Actinobacteria* in interfacial micropipetting-based droplets schematic illustration of methods and workflow^[43]. A: Principle of interfacial micropipetting (IMP). B: Screening pipeline for antagonistic interaction between *Actinobacterial* strains and GFP-labeled *Staphylococcus aureus* RN4220.

近些年, 研究者们提出了越来越多的微生物新型分离培养策略, 大致可分为两类: 一是在传统的分离培养方法上进行改良; 二是设计模拟原生环境的高通量微生物培养方法^[10]。其中第1种主要包括在分离培养基中添加群落相

互作用的小分子物质、电子供体、氨基酸等小分子物质以促进微生物的生长^[14,49-51]; 或是稀释培养基的营养物质浓度, 延长培养时间, 促进生长缓慢以及寡营养类微生物的生长^[52]。第2种则是设计出如基于膜扩散(扩散生物反应器、

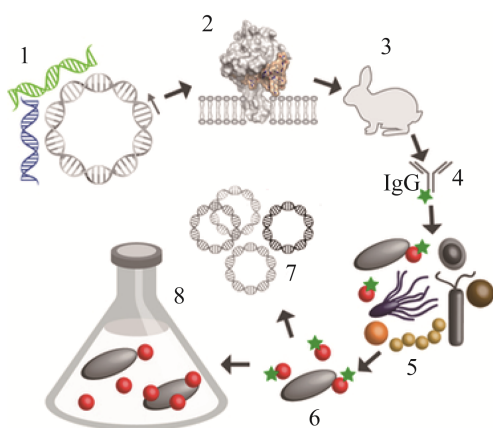


图4 反向基因组学进行靶向微生物分离^[48] 1: SAG和MAG中膜蛋白编码基因的鉴定; 2: 选择预测的表位; 3: 抗体产生; 4: 抗体纯化和荧光标记; 5: 抗体与环境样品微生物混合; 6: 抗体标记目标微生物; 7: 基因组测序; 8: 分离培养
Figure 4 Reverse genomics for targeted isolation^[48]. 1: Identification of membrane protein-encoding genes in SAGs and MAGs; 2: Selection of predicted exposed epitopes; 3: Antibody production; 4: Purification and fluorescent labeling; 5: Antibodies are added to environmental cell samples; 6: The antibodies label the target cells; 7: Genomic sequencing; 8: Cultivation.

土壤基质膜系统等)、微流控技术(滑动芯片、纳米多孔微生物培养系统、微液滴培养技术)和细胞分选技术(荧光激活细胞分选、拉曼激活细胞分选和反向基因组学筛选)等分离培养方法去筛选获得未/难培养的微生物菌种资源。

虽然研究者们针对获得未/难培养微生物做了许多努力和尝试,运用这些技术极大地丰富了可培养微生物类群,并为开发这些微生物资源奠定了良好的基础,但环境中的大部分微生物仍然处于未培养状态。究其原因,首先,我们对微生物所需的必要营养物质、信号分子以及复苏基质等缺乏足够的认识;其次,虽然高通量培养技术已经被运用于微生物的分离培养,但仍然存在着弊端,如设备昂贵、操作复

杂、不能普及使用等^[9]。因此,尽管我们已经在微生物分离培养方法上取得一定的进展,这些技术极大地丰富了可培养微生物类群,但微生物生存环境复杂,未/难培养微生物数量庞大、种类繁多,在探索微生物多样性及可培养性的道路上仍面临着巨大挑战。

分离培养环境中未/难培养微生物虽说是挑战,但同时也是机遇。针对目前存在的各种困难,分析原因、积极探索,创新设计出更多样的分离培养策略是我们的当务之急。同时,将多种方法结合,实现既满足共生物需求又能解除竞争、拮抗抑制作用,也是获得更多未/难培养微生物资源的思路之一。

REFERENCES

- [1] UPHOFF HU, FELSKE A, FEHR W, WAGNER-DÖBLER I. The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: a molecular screening of marine isolates[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 35(3): 249-258.
- [2] 朱红惠, 黄力, 李文均, 李猛. 未/难培养微生物: 风正扬帆再起航, 共辉煌[J]. *微生物学报*, 2021, 61(4): i-ii.
ZHU HH, HUANG L, LI WJ, LI M. Uncultivated microorganisms: it is time to refocus and refLOURISH to the special issue "Uncultivated Microorganisms"[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(4): i-ii (in Chinese).
- [3] 周恩民, 李文均. 未培养微生物研究: 方法、机遇与挑战[J]. *微生物学报*, 2018, 58(4): 706-723.
ZHOU EM, LI WJ. Uncultivated microorganisms study: methods, opportunities and challenges[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(4): 706-723 (in Chinese).
- [4] JIAO JY, LIU L, HUA ZS, FANG BZ, ZHOU EM, SALAM N, HEDLUND BP, LI WJ. Microbial dark matter coming to light: challenges and opportunities[J]. *National Science Review*, 2021, 8(3): nwaa280.
- [5] HAMM JN, ERDMANN S, ELOE-FADROSH EA, ANGELONI A, ZHONG L, BROWNLEE C, WILLIAMS TJ, BARTON K, CARSWELL S, SMITH MA, BRAZENDALE S, HANCOCK AM, ALLEN MA, RAFTERY MJ, CAVICCHIOLI R. Unexpected host

- dependency of antarctic *Nanohaloarchaeota*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(29): 14661-14670.
- [6] REIMER LC, VETCININOVA A, CARBASSE JS, SÖHNGEN C, GLEIM D, EBELING C, OVERMANN J. BacDive in 2019: bacterial phenotypic data for high-throughput biodiversity analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D631-D636.
- [7] PARTE AC, CARBASSE JS, MEIER-KOLTHOFF JP, REIMER LC, GOKER M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(11): 5607-5612.
- [8] LEWISH 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.
- [9] 熊盈盈, 莫祯妮, 邱树毅, 曾祥勇. 未培养环境微生物培养方法的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(5): 1765-1779.
- XIONG YY, MO ZN, QIU SY, ZENG XY. Research progress on culture methods of uncultured environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2021, 48(5): 1765-1779 (in Chinese).
- [10] 陈丽媛. 微生物培养技术研究进展[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(6): 93-95.
- CHEN LY. Advanced in microbial technology on cultivation[J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(6): 93-95 (in Chinese).
- [11] VARTOUKIAN SR. Cultivation strategies for growth of uncultivated bacteria[J]. Journal of Oral Biosciences, 2016, 58(4): 142-149.
- [12] LENNON JT, JONES SE. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(2): 119-130.
- [13] HIDALGO-AHUMADA CAP, NOBU MK, NARIHIRO T, TAMAKI H, LIU WT, KAMAGATA Y, STAMS AJM, IMACHI H, SOUSA DZ. Novel energy conservation strategies and behaviour of *Pelotomaculum schinkii* driving syntrophic propionate catabolism[J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(12): 4503-4511.
- [14] HALL-STOODLEY L, COSTERTON JW, STOODLEY P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(2): 95-108.
- [15] LOVLEY DR. Syntrophy goes electric: direct interspecies electron transfer[J]. Annual Review of Microbiology, 2017, 71: 643-664.
- [16] 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.
- 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).
- [17] 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.
- 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).
- [18] FAUST K, RASE J. Microbial interactions: from networks to models[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(8): 538-550.
- [19] STAMS AJM, PLUGGE CM. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(8): 568-577.
- [20] ZENGLER K, ZARAMELA LS. The social network of microorganisms-how auxotrophies shape complex communities[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(6): 383-390.
- [21] SOKOLOVSKAYA OM, SHELTON AN, TAGA ME. Sharing vitamins: cobamides unveil microbial interactions[J]. Science, 2020, 369(6499): eaba0165.
- [22] IMACHI H, NOBU MK, NAKAHARA N, MORONO Y, OGAWARA M, TAKAKI Y, TAKANO Y, UEMATSU K, IKUTA T, ITO M, MATSUI Y, MIYAZAKI M, MURATA K, SAITO Y, SAKAI S, SONG CH, TASUMI E, YAMANAKA Y, YAMAGUCHI T, KAMAGATA Y, TAMAKI H, KEN TK. Isolation of an archaeon at the prokaryote-eukaryote interface[J]. Nature, 2020, 577(7791): 519-525.
- [23] HALL-STOODLEY L, COSTERTON JW, STOODLEY P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(2): 95-108.
- [24] XIAN WD, SALAM N, LI MM, ZHOU EM, YIN YR, LIU ZT, MING YZ, ZHANG XT, WU G, LIU L, XIAO M, JIANG HC, LI WJ. 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.

- [25] SALAM N, XIAN WD, ASEM MD, XIAO M, LI WJ. From ecophysiology to cultivation methodology: filling the knowledge gap between uncultured and cultured microbes[J]. Marine Life Science and Technology, 2021(2): 132-147 (in Chinese).
- [26] 叶姜瑜, 罗固源. 微生物可培养性低的生态学释因与对策[J]. 微生物学报, 2005, 45(3): 478-482.
YE JY, LUO GY. Ecological interpretation and related strategies for low culturability of microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(3): 478-482 (in Chinese).
- [27] 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.
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).
- [28] KONNEKE M, BERNHARD AE, de la TORRE JR, WALKER CB, WATERBURY JB, STAHL DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. Nature, 2005, 437(7058): 543-546.
- [29] LI S, DONG L, LIAN WH, LIN ZL, LU CY, XU L, LI L, HOZZEIN WN, LI WJ. Exploring untapped potential of *Streptomyces* spp. in Gurbantunggut Desert by use of highly selective culture strategy[J]. Science of The Total Environment, 2021, 19(4): 225-240.
- [30] KOPKE B, WILMS R, ENGELEN B, CYPIONKA H, SASS H. 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.
- [31] 张君红, 王健宇, 孟泽昕, 何佳, 董政宏, 刘凯茜, 陈文青. 土壤微生物多样性通过共现网络复杂性表征高寒草甸生态系统多功能性[J]. 生态学报, 2022, 42(7): 2542-2558.
ZHANG JH, WANG JY, MENG ZX, HE J, DONG ZH, LIU KQ, CHEN WQ. Soil microbial richness predicts ecosystem multifunctionality through co-occurrence network complexity in alpine meadow[J]. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(7): 2542-2558 (in Chinese).
- [32] 鲜文东, 张潇潼, 李文均. 绿弯菌的研究现状及展望[J]. 微生物学报, 2020, 60(9): 1801-1820.
XIAN WD, ZHANG XT, LI WJ. Research status and prospect on bacterial phylum *Chloroflexi*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(9): 1801-1820 (in Chinese).
- [33] KAEBERLEIN T, LEWIS K, EPSTEIN SS. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. Science, 2002, 296(5570): 1127-1129.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] SVENNING MM, WARTIAINEN I, HESTNES AG, BINNERUP SJ. Isolation of methane oxidising bacteria from soil by use of a soil substrate membrane system[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44(3): 347-354.
- [37] CHAUDHARY DK, KHULAN A, KIM J. Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 6666.
- [38] 郭斌, 吴晓磊, 钱易. 提高微生物可培养性的方法和措施[J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 504-507.
GUO B, WU XL, QIAN Y. Approaches for increasing the culturability of microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(3): 504-507 (in Chinese).
- [39] DU WB, LI L, NICHOLS KP, ISMAGILOV RF. SlipChip[J]. Lab on a Chip, 2009, 9(16): 2286-2292.
- [40] GE ZF, GIRGUIS PR, BUIE CR. Nanoporous microscale microbial incubators[J]. Lab on a Chip, 2016, 16(3): 480-488.
- [41] KAMINSKI TS, SCHELER O, GARSTECKI P. Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges[J]. Lab on a Chip, 2016, 16(12): 2168-2187.
- [42] HU BY, YE S, CHEN DW, XIE BL, HU R, QIAO YX, YU YH, YU HY, ZHENG X, LAN Y, DU WB. Tunable and contamination-free injection with microfluidics by stepinjection[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(39): 13112-13117.
- [43] 张思琦, 王剑, 兰英, 贡娟莉, 陈建, 何湘伟, 杜文斌. 抗菌活性放线菌的界面微滴移液互作分离筛选方法[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 325-335.
ZHANG SQ, WANG J, LAN Y, YUN JL, CHEN J, HE XW, DU WB. Isolating and screening for antimicrobial *Actinobacteria* in interfacial micropipetting-based

- droplets[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 325-335 (in Chinese).
- [44] WANG XL, CHEN SX, KONG M, WANG ZK, COSTA KD, LI RA, SUN D. Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies[J]. Lab on a Chip, 2011, 11(21): 3656-3662.
- [45] WAGNER M, HAIDER S. New trends in fluorescence *in situ* hybridization for identification and functional analyses of microbes[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(1): 96-102.
- [46] HAROON MF, SKENNERTON CT, STEEN JA, LACHNER N, HUGENHOLTZ P, TYSON GW. In-solution fluorescence *in situ* hybridization and fluorescence-activated cell sorting for single cell and population genome recovery[J]. Methods in Enzymology, 2013, 531: 3-19.
- [47] LAU AY, LEE LP, CHAN JW. An integrated optofluidic platform for Raman-activated cell sorting[J]. Lab on a Chip, 2008, 8(7): 1116-1120.
- [48] CROSS KL, CAMPBELL JH, BALACHANDRAN M, CAMPBELL AG, COOPER CJ, GRIFFEN A, HEATON M, JOSHI S, KLINGEMAN D, LEYS E, YANG Z, PARKS JM, PODAR M. Targeted isolation and cultivation of uncultivated bacteria by reverse genomics[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(11): 1314-1321.
- [49] CHANG L, CHEN ZB, LI TJ. Research progress on the “viable but nonculturable” state of vibrios[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010(4): 411-415.
- [50] 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.
- [51] KIM S, KANG I, SEO JH, CHO JC. Culturing the ubiquitous freshwater actinobacterial acI lineage by supplying a biochemical ‘helper’ catalase[J]. bioRxiv, 2018, DOI: 10.1101/343640.
- [52] 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.