

基于应用场景的微生物组工程化策略

王敬敬^{1,2}, 徐松^{1,2}, 赵维^{1,2}, 侍浏洋^{1,2}, 王兴彪^{1,2}, 韩一凡^{1,2}, 张小霞^{1,2}, 黄志勇^{*1,2}

1 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津市工业生物系统与过程工程重点实验室, 天津 300308

2 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

王敬敬, 徐松, 赵维, 侍浏洋, 王兴彪, 韩一凡, 张小霞, 黄志勇. 基于应用场景的微生物组工程化策略[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 4909-4921.

WANG Jingjing, XU Song, ZHAO Wei, SHI Liuyang, WANG Xingbiao, HAN Yifan, ZHANG Xiaoxia, HUANG Zhiyong. Microbiome engineering strategies in different application scenarios[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 4909-4921.

摘要: 微生物组在工业、农业、环境、健康等多个领域有巨大的应用潜力, 如何构建高效稳定的微生物组, 并通过工程化将其应用至各个领域是当前研究的重点和难点。总结分析微生物组的构建策略, 以促进微生物组在不同场景下的工程化应用。首先根据应用需求将微生物组的应用场景分为封闭系统、半封闭系统和开放系统, 然后回顾了在这3种系统中已有的微生物组构建策略, 特别分析了其特点和局限, 最后根据不同系统的特点, 结合实际应用的经验反馈, 针对性地提出了微生物组的构建策略。在封闭系统中, 主要利用“自下而上”的方法合成微生物组, 对微生物个体信息要求较高, 对微生物组的效率要求较高; 在半封闭和开放系统中, 同时利用“自上而下”和“自下而上”的方法构建微生物组, 对微生物组的稳定性和安全性要求较高。在不同应用场景中, 构建微生物组的策略和侧重点不同, 应根据实际情况选择合适的策略构建高效的微生物组。

关键词: 微生物组; 构建策略; 封闭系统; 开放系统; 效率; 稳定性

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2102200); 天津市科技计划(23YFYSHZ00050); 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-IJCP-001)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2102200), the Tianjin Science and Technology Project (23YFYSHZ00050), and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-IJCP-001).

*Corresponding author. E-mail: huang_zy@tib.cas.cn

Received: 2024-06-26; Accepted: 2024-08-25; Published online: 2024-09-12

Microbiome engineering strategies in different application scenarios

WANG Jingjing^{1,2}, XU Song^{1,2}, ZHAO Wei^{1,2}, SHI Liuyang^{1,2}, WANG Xingbiao^{1,2}, HAN Yifan^{1,2}, ZHANG Xiaoxia^{1,2}, HUANG Zhiyong^{*1,2}

1 Tianjin Key Laboratory for Industrial Biological Systems and Bioprocessing Engineering, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

2 National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

Abstract: Microbiomes have great application potential in industry, agriculture, environment, health, etc. In practice, it is still difficult to construct efficient and stable microbiomes and utilize the engineered microbiomes in various application fields. To summarize and analyze the construction strategies of microbiomes, thus facilitating the engineering of microbiomes for application in different scenarios. We first classified the application scenarios of microbiomes into closed, semi-closed, and open systems according to the application requirements and then reviewed the existing microbiome construction strategies in the three systems, especially focusing on their characteristics and limitations. Finally, according to the characteristics of different systems and the empirical feedback from practical applications, we proposed the microbiome construction strategies. In the closed system, the microbiome is mainly synthesized by the bottom-up method, which has high requirements for microbial individual information and microbiome efficiency. In semi-closed and open systems, the microbiome is constructed by top-down and bottom-up methods, which require high stability and safety of the microbiome. In diverse application scenarios, the strategies and focuses of constructing microbiomes are different, and appropriate strategies could be chosen to construct efficient microbiomes according to the actual situations.

Keywords: microbiome; construction strategies; closed system; open system; efficiency; stability

自然界中的微生物很少单独存在,通常多种微生物共同生存,形成微生物组,参与人类和动植物健康、地球生物化学循环等^[1]。近年来,随着测序技术的迅猛发展,人们对微生物组的认识越来越深刻,其在保持人类和动植物健康、提高作物产量、治理环境污染、生产高值化合物等方面具有巨大的潜力^[2-3]。

如何构建高效、稳定的微生物组,并通过工程化将其应用至各个领域仍然是当前研究的重点和难点。Lawson 等^[4]综述了 2 种微生物组构建策略,其中“自上而下”是指使用精心选择

的环境变量(例如某些底物负载率、平均细胞保留时间和氧化还原条件等),通过生态选择强制已有的微生物组(自然发生或接种)执行某种功能;而“自下而上”是指将 2 种以上不同功能的菌株组装成群落以执行某种功能。这些策略大大促进了微生物组的发展和应^[5-7]。

具体而言,微生物组的应用极为宽广,涉及工业、农业、环境、健康、能源等众多领域^[8-9],不同场景的应用需求差别巨大,相应的微生物组工程化构建策略也无法统一。本文拟根据不同应用场景,总结常用的微生物组工程化构建

策略, 并分析其特点和局限, 以期为不同应用场景高效微生物组的构建、促进微生物组的产业应用提供借鉴。

1 微生物组工程化策略

随着对微生物组的深入研究, 人们逐渐意识到其工程化过程非常复杂, 目前尚无适用所有应用需求的微生物组构建策略。必须以需求为导向, 选择适合的构建策略, 才可能获得匹配度高、功能性强、稳定性好的工程微生物组。本文根据需求将微生物组的应用场景分为封闭系统、半封闭系统和开放系统。通过分析 3 种系统中已有微生物组构建策略的特点及局限, 结合实际应用的经验反馈, 根据不同系统的特点, 针对性地提出了微生物组的构建策略。

1.1 封闭系统下的微生物组工程化策略

1.1.1 封闭系统的环境特征

封闭系统是指与外界环境无交流的系统, 即微生物组不与外部环境发生物质和能量交换, 如工业发酵等。由于封闭系统中的环境变量可人为控制, 因此微生物组的功能和效率是关注重点。在工业发酵中, 大多以高产为目标, 利用微生物组将生物质转化为燃料、材料、化学品等。封闭系统还常用于探索物种相互作用的科学研究。

1.1.2 封闭系统现有构建微生物组策略分析

目前基于封闭系统的微生物组构建大多采用“自下而上”的策略。较为常见的方法是通过基因工程改造微生物, 将代谢途径分配到不同的微生物菌株中, 从而减轻单个微生物的代谢负担^[10]。较为经典的案例是 Zhao 等^[11]研发的“Y 型人工菌群”, 包括一株能够优先利用葡萄糖高产丁醇的大肠杆菌(*Escherichia coli*) EB243 和一株能够高效利用木糖高产丁醇的大肠杆菌(*Escherichia coli*) EB243X。“Y 型人工菌群”可

以混合糖为原料进行批式发酵, 可生产约 21 g/L 丁醇, 得率为理论值的 85%, 是目前报道利用混合糖生产丁醇的最高水平(图 1A); 在该例中, 研究者重点关注细胞内部代谢途径、细胞间途径的整合, 以及双菌比例的适应性调整, 目标在于提高产量, 增强菌群对发酵条件的适应性和稳定性, 充分证明了利用同属种的工程菌构建微生物组的工业应用潜力^[11]。Zhou 等^[12]则尝试了将细菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) TaxE1 与真菌酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) TaxS1 共培养高效生产含氧紫杉烷(图 1B), 研究者基于代谢接力的思路, 将合成含氧紫杉烷的途径分为 2 个模块, 分别在酿酒酵母和大肠杆菌中表达。大肠杆菌 TaxE1 利用葡萄糖生产杉二烯, 杉二烯再被酿酒酵母氧化生成含氧紫杉烷。这不仅实现了在同一个生物反应器中稳定生产含氧紫杉烷, 而且还实现了跨物种的微生物组构建。在更复杂的植物源天然产物合成中, Jones 等^[13]构建了包含 4 株菌的生物联合体, 他们分别将 15 种酶和转录因子的过表达匹配到 4 个独立的大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株模块上, 通过分散代谢负担的方式, 实现了花青素的生物全合成(图 1C)。还有很多通过基因改造和菌株共代谢实现目标产物提升的案例, 大部分研究都集中在大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等模式微生物^[14-16]。

此外, 还有一些研究利用具有不同生理生态功能的野生菌株合成特定功能的微生物组, 例如一些研究利用嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)和嗜酸菌(*Acidiphilum* spp.)合成微生物组进行硫铁矿开采^[17]。嗜酸氧化亚铁硫杆菌在硫铁矿浸出中具有明显优势, 但因其严格自养, 环境中的有机物

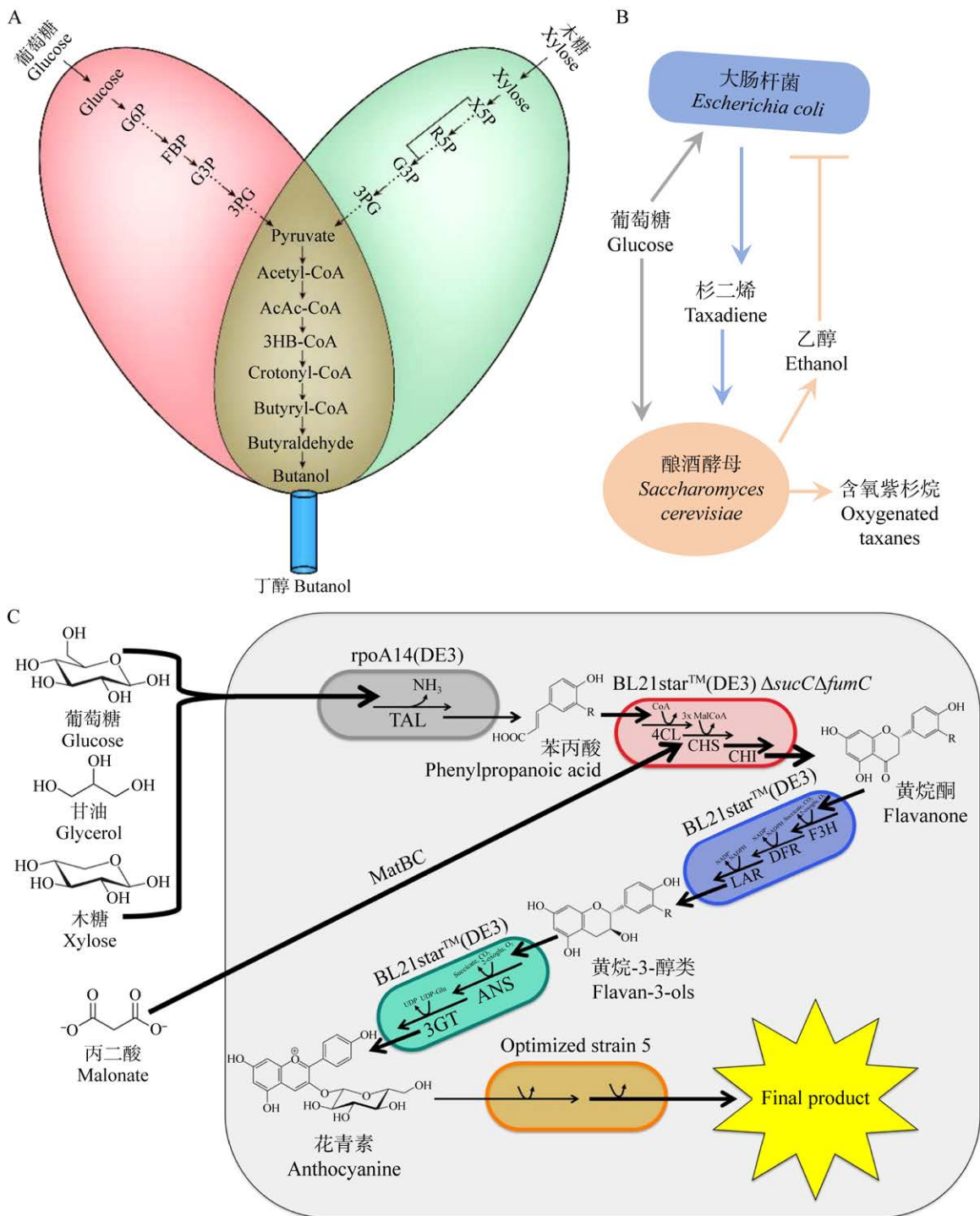


图1 利用工程菌构建微生物组的案例 A: 同时利用葡萄糖和木糖产丁醇的“Y型人工菌群”^[11]. B: 利用大肠杆菌和酿酒酵母共培养生产含氧紫杉烷^[12]. C: 多菌联合从头合成花青素^[13]

Figure 1 Examples of using engineered bacteria to construct microbiomes. A: “Y-shaped artificial bacterial colony” that produces butanol from glucose and xylose simultaneously^[11]. B: Co-culture of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* to produce oxygenated taxanes^[12]. C: *De novo* synthesis of anthocyanins by multiple bacterial strains^[13].

会抑制其生理活性。引入兼性营养型的嗜酸菌可以消除有机物对嗜酸氧化亚铁硫杆菌的抑制,从而显著提升硫铁矿的浸出效果^[18]。另外,在厌氧环境下,利用梭菌作为初级生产者,硫酸盐还原菌作为次级生产者进行共同培养,可显著改变梭菌产乳酸的路径,提高氢气的产量^[19]。因此,利用野生菌株间的代谢特征、生态互作等进行物种组合,形成互补优势,也可以构建具有某种高效功能的微生物组。

1.1.3 封闭系统中构建微生物组面临的挑战

采用基因工程菌构建微生物组的主要挑战是工程菌的遗传不稳定、系统不稳定等^[13,20]。由工程菌株构建的微生物组在应用中往往存在复杂的系统性问题,比如通过不同代谢模块组合构建的工程菌株合成目标物,对于初始菌株比例的微量变动会高度敏感,导致协作菌株生产力的改变,规模化生产中可能会导致涉及补料批次、高细胞密度培养过程中许多不确定的因素。此外,多模块之间的连接,如果存在限制/瓶颈模块消耗途径中更高效模块的可用空间时,也会导致部分模块的所需生物量受限,从而影响层级扩大培养的效果^[13]。而利用野生型微生物菌株进行微生物组构建,则需要巨大的菌种资源和文献支持,对野生菌株的生理生化特征和遗传性状均要有深刻的了解。采用传统的组学培养策略需要耗费巨大的人工、物力、时间。如何在数以万计的菌种资源中找到最优的组合是目前面临的一大难题。

1.1.4 封闭系统中构建微生物组的建议

无论是利用基因工程菌还是野生菌构建微生物组,均应深入了解各个菌株的生理、生态功能,及物种间的相互作用,特别是物质、能量、信号交流等,才能构建高效稳定的微生物组。在微生物组构建中应用代谢网络模型将会促进对微生物组的认识,加深对物种间相互作

用的理解。一种推荐的用于封闭系统微生物组构建的策略如下:首先,通过文献调研、数据库查找(如基因组数据库、蛋白数据库等)定位到符合目标的菌株种类,然后通过分离筛选、购买等方式获得原始菌株。在此基础上,利用半自动化模型构建软件(如 ModelSEEd、CarveMe、RAVEN、MetaGEM)构建模型^[21],测试一些路径的改变对目标产物的影响,从而指导工程菌的构建。针对双菌或多菌组合,基于模型算法,可以模拟代谢交换、优化菌株组合,从而提升目标功能。一些专业的软件如 SMETANA^[22]、NECom^[23]可进行不同菌种之间的代谢互作模拟,COMETS 可进行菌群内不同物种生长过程的模拟^[24]。利用这些生物计算工具,结合湿实验验证,可以更加精确地获取微生物之间的代谢互作关系,从而提升菌群性能。这些工具为寻找、分析、验证潜在的微生物菌种提供了强大的数据支持,助力封闭系统下的微生物组构建(图 2)。

1.2 半封闭系统下的工程化策略

1.2.1 半封闭系统的环境特征

半封闭系统是指与外界环境间歇、短暂、部分交流的系统,如肠道、沼气、固体酿造等系统。在半封闭系统中微生物组主要会受到土著环境(温度、土著微生物等)的影响,还会间歇、部分受到外界环境(温度、外源微生物等)的影响,但受干扰程度与开放系统相比影响较少。

1.2.2 半封闭系统中现有构建微生物组策略分析

肠道微生物组或可作为半封闭系统微生物组的典型代表,因为其主要是受宿主本身的影响,并间歇性地受到外界因素(如饮食、药物等)的影响。肠道微生物组是人体内部的重要生态系统^[25],由生存在人体消化系统中的超过数百种微生物共同构成。肠道微生物组平衡与健康状态对个体的整体健康具有深远影响,包括

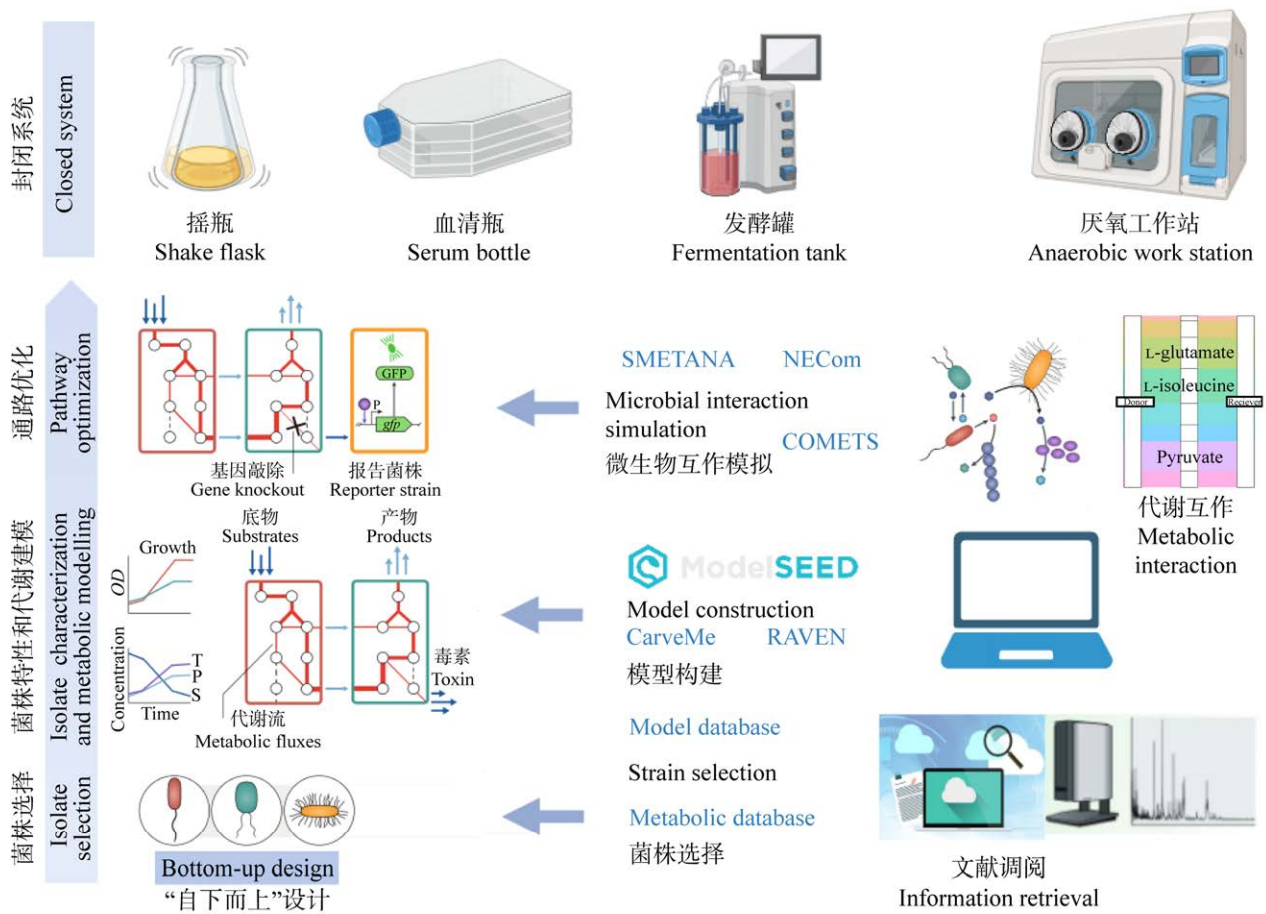


图2 用于封闭系统微生物组构建策略的示意图 通过文献调阅、数据库查找等方式选定用于构建微生物组的菌株,通过分离筛选获得菌株资源,利用菌株特性和代谢建模指导合成微生物组,通过互作模拟等优化通路,获得更高效的微生物组^[21-24]

Figure 2 Schematic diagram of the closed system microbiome construction strategy. The strains used to construct the microbiome are selected through literature review, database search, etc., the strain resources are obtained through separation and screening, the strain characteristics and metabolic modeling are used to guide the synthesis of the microbiome, and a more efficient microbiome is obtained through optimization pathways such as interaction simulation^[21-24].

消化系统、免疫系统、神经系统等多个方面^[26]。因此,当肠道微生物组失衡时,可能会导致一系列的健康问题,如肥胖、糖尿病、炎症性肠病等^[27-28]。

随着合成生物学的发展,肠道微生物组人工构建的研究越来越多,这加深了人们对肠道微生物与健康关系及其科学特性的理解^[3]。目前,肠道微生物组的构建采用两种策略构建,

从“自下而上”的细胞间过程(如交叉喂养、共生和营养缺陷型)到“自上而下”的群落自组装过程(如群落结构和复原力)都是合成肠道微生物组的基本方法。大多数早期体外合成肠道微生物组大多采用“自下而上”的方式,选用的菌种数量少,更侧重于益生菌对其他肠道共生菌或病原体的抑制作用的研究^[29-30]和应用,如市场上常见的益生菌剂制品“妈咪爱”、三联或五联

益生菌等。2022年, Cheng等^[31]构建了由119种细菌组成的复杂肠道微生物组, 并成功移植到小鼠体内, 揭示了微生物组与生命健康间的关联机制; 在此研究中, 通过分析人类微生物组计划(human microbiome project, HMP)产生的宏基因组数据, 选出超过100种普遍存在于HMP受试者肠道内的微生物菌种, 在体外构建了一个由104种细菌组成的hCom1微生物组。hCom1具有良好的稳定性, 其中98%的物种能够在无菌小鼠肠道内长期定殖; 为了更好地模拟天然肠道菌群, 研究人员进一步将人类粪便中的微生物引入到定殖hCom1小鼠的肠道内, 发现多种新的细菌物种成功定殖并填补了空缺的生态位, 成功构建了包含119种细菌物种的hCom2合成微生物组。hCom2与小鼠天然微生物组一样, 能够抵御大肠杆菌引发的感染, 是一种理想的肠道微生物组研究模型^[31]; 该研究成功构建了一个组成明确、高度复杂(含有119个菌株)且更能有效地反映人类肠道菌群作用的人工合成微生物组。近年来, 利用“自上而下”策略构建肠道微生物组的代表技术是粪菌移植(fecal microbiota transplantation, FMT)。目前全球已有多个使用FMT帮助患者恢复肠道功能的成功报道^[32-33]。

1.2.3 半封闭系统中构建微生物组面临的挑战

尽管粪菌移植、悉生小鼠等实验方法为微生物组的工程化构建提供了有力的支持, 半封闭系统下肠道微生物组的构建仍存在一定局限性。例如粪菌移植方法所使用的菌群样本虽然最大程度地反映了人类肠道菌群的真实情况, 但其物种组成不明, 难以剖析具体发挥作用的微生物。此外, 粪菌移植的方法存在一定的风险性, 虽然国际和国内都已有操作指南, 但尚无规范的国家法律法规^[34]。关于构建人工合成微生物群落的方法研究虽然组成明确, 但是复

杂度低(通常少于20个菌株), 无法反映不同肠道微生物之间复杂多变的互作关系。上述局限性在一定程度上阻碍了合成肠道微生物组的应用, 因此, 当前亟须开发物种组成明确且具有更高复杂度的人工合成微生物群落和菌群网络数据模型, 以便更好地推动肠道微生物组合成领域的发展。

1.2.4 半封闭系统中构建微生物组的建议

确保人工构建肠道菌群的安全性和稳定性是一个复杂且关键的问题。为了构建安全、高效地用于粪菌移植的肠道微生物组, 首先要严格筛选健康供体, 确保它们的肠道菌群健康、无病原体和潜在的有害微生物, 人工构建肠道菌群的组成和功能需要综合运用供体筛选、合成生物学方法、益生菌和益生元的补充、饮食调整、药物干预等多种策略和方法; 其次要选择安全有效的菌群移植方法, 避免使用可能增加感染风险的途径, 在移植过程中, 确保操作的无菌性和环境的清洁度, 以减少外部污染的可能性; 此外在菌群移植后, 对患者进行定期的肠道菌群监测, 包括菌群组成、功能活性等。未来应将多组学、代谢网络模型等结合到肠道微生物组生态系统设计中, 如利用AGORA^[21]、microbeMASST(<https://masst.gnps2.org/microbemasst/>)等工具^[35], 将微生物组信息转化为治疗方法。肠道微生物组人工构建是一个充满挑战和机遇的领域。随着技术的不断进步和研究的深入, 相信我们会更好地理解肠道微生物组的功能和机制, 并开发出更加安全、有效的治疗方法来应对与肠道微生物组失衡相关的各种疾病。

1.3 开放系统下的工程化策略

1.3.1 开放系统的环境特征

开放系统是指与外界环境始终保持交流的系统, 往往是自然条件下的系统, 如土壤、水体等。在开放系统中微生物组的应用不仅会持

续受到外界环境(温度、降水等)的影响和干扰,还会持续与土著和空气微生物相互作用。这就要求工程微生物组必须具备极强的稳定性和抗干扰能力,对效率要求相对较低(作用时间可为几天或更长时间)。

1.3.2 开放系统中现有构建微生物组策略分析

在开放系统中,“自下而上”和“自上而下”构建微生物组的策略均有大量应用。采用“自下而上”策略构建的微生物组大多应用于农业种植,如 Begum 等^[36]将具有解磷功能的丛枝菌根真菌变形球囊霉(*Glomus versiforme*)和植物根际促生菌甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)联合接种,通过提高抗氧化和矿物质营养代谢,改善干旱胁迫下烟草的生长和光合作用。Zhou 等^[37]通过比较病害组和健康组番茄根际微生物组的差异,明确了健康组显著富集的细菌和真菌物种,筛选并合成了跨界的微生物组,可高效防控番茄的枯萎病。此外,也有一些研究采用“自下而上”的策略构建用于污水处理的微生物组,如 He 等^[38]利用脱氮菌鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)合成的微生物组可高效去除水体中的硝态氮。这些微生物组使用后,大多会定殖于土壤、水体等环境中,并与土著和外界环境互作,改善土壤、水体等环境及其中的微生物群落结构和功能,富集有益菌,抑制有害菌,从而促进作物生长,加速污染物降解等。虽然很多研究强调在“自下而上”合成微生物组时,应选择无拮抗作用的物种进行构建,但最近也有报道,物种间的拮抗作用可能不会影响合成微生物组在开放系统的应用效果^[39-40]。

采用“自上而下”策略构建的微生物组应用在污染物降解、去除中的报道较多。如 Xu 等^[41]利用农药阿特拉津富集驯化土壤中的微生物,

获得了可高效降解阿特拉津的微生物组。Lin 等^[42]利用高温高浓度氨废水从活性污泥中富集驯化了微生物组,在 50 °C 时表现出优异的脱氮和化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)去除能力。朋婷婷等^[43]利用磁性纳米粒子介导分离技术(nanoparticle-mediated isolation, MMI)获得能够高效降解转化 3,3',4,4'-四氯联苯的微生物组。此外,也有一些研究采用“自上而下”的策略构建用于农业种植的微生物组,如 Panke-Buisse 等^[44]利用人工选择的方法连续选择早或晚开花的拟南芥根际微生物组接种下一代拟南芥种子,实现对拟南芥开花时间的控制。

将“自上而下”和“自下而上”相结合的方法主要是利用富集驯化等方法获得高效微生物组,再利用微生物组学技术明确关键物种,通过培养组学获得关键物种,进而再合成高效的微生物组。如 Ruan 等^[45]以除草剂为底物,从自然土壤中富集驯化了除草剂降解微生物组,并从中鉴定了关键物种。利用培养组学技术获得了这些关键物种,并利用代谢网络模型从中选择了适配的物种,合成了生物修复增强的微生物组。

1.3.3 开放系统中构建微生物组面临的挑战

由于开放系统中存在持续波动性的物质和能量交换,以及与外部微生物的代谢产物交换,因此构建功能长期稳定的微生物组仍是未来研究的核心目标。通常“自下而上”构建的微生物组缺乏足够的稳定性,如 Rawat 等^[46]利用 3 株解磷菌地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),分散泛菌(*Pantoea dispersa*)和葡萄球菌(*Staphylococcus spp.*)构建的微生物组在 2018 年使得水稻产量提升了 50.58%,但 2019 年的产量仅提高了 35.64%。而“自上而下”构建的微生物组,其稳定性一般优于“自下而上”构建的微生物组。例如同样是产沼气的微生物组,采用“自上而下”策略的稳

定性更优异^[47]。另外，如何快速构建适用于特定开放环境的微生物组也是未来研究的重要目标。利用“自上而下”构建微生物组方面，初始微生物组的选择，微生物组的富集、筛选方法等仍需进一步明确相关的方法。利用“自下而上”合成微生物组方面，如何选择适配物种进行合理的组装，以实现协同效果仍是本领域亟待突破的难点。此外，利用“自上而下”和“自下而上”构建的微生物组都含有2个以上的菌株，“自上而下”构建的微生物组中还包含很多不可培养物种，因此在保持功能稳定性的前提下如何进行连续扩大培养一直是其规模化应用的瓶颈。

1.3.4 开放系统中构建微生物组的建议

针对用于开放系统微生物组稳定性的问题，首先在构建微生物组时应参考实际应用场景的环境条件波动情况，将环境条件波动应用于高效微生物组的筛选中；其次，深入研究微生物组中物种间的高阶相互作用及群落结构和功能对环境条件波动的响应，可为稳定微生物组的构建奠定坚实的理论基础。对于“自下而上”合成微生物组方向，可选择功能互补的物种进行构建，也可通过比较微生物组靶向选择富集物种进行构建。在物种选择时应充分考虑安全性。此外，利用代谢网络模型预测技术可实现物种选择的科学性和效率，也可模拟不同环境因子干扰对微生物组稳定性的影响，因此可大力推动稳定微生物组的理性高效合成。对于“自上而下”构建用于开放环境的微生物组，可综合利用富集驯化、人工选择、磁性选择等构建用于开放环境的功能微生物组，并利用多组学、数学建模等对其进行解析和优化。在微生物组的作用机理指导下，可通过控制代谢底物、环境因子、时空秩序等实现微生物组的共培养，从而推动其的规模化应用。此外，针对物种较

少的微生物组也可采取单菌发酵，使用时再混合的方法。总之，对于用于开放系统的微生物组，建议综合采用“自上而下”和“自下而上”相结合的策略构建高效、稳定的功能微生物组，优化共培养发酵技术，以实现功能微生物组的规模化应用。

2 展望

根据应用场景的差异，我们针对封闭系统、半封闭系统及开放系统提出并实践不同的微生物群落构建策略，每种微生物组构建都需要根据特定的条件和需求，做到提高效率与系统稳定的平衡，且每一种系统都面临着不同的挑战和机遇(图3)。

对于封闭系统，应以精细化管理和控制为主要发展方向。由于封闭系统与外界无交流，效率可以成为首要考虑的因素，通过深入理解微生物间相互关系并通过精确控制微生物种群比例以提升群落效能，并有望在固液培养、内环境条件调节等方面取得新突破。此外如何选择功能菌种以及构思菌种的合成方式以利于形成共代谢或者接力代谢并具有稳定的功能也是一个发展方向与重大挑战。

对于半封闭系统和开放系统的微生物群落构建策略则更为复杂。由于这2种系统都存在着与外界环境的物质和能量交换，需求复杂性与微生物群落稳定性之间的矛盾更大。构建策略上不仅要求微生物群落有稳定性，也需要有适应性，以应对环境的持续变化和菌群复杂性带来的挑战。在这种情况下，稳定性会居于更重要的位置，并且也要重点考虑生物安全，避免由于过度改造对周边环境造成干扰。因而开发多元的新材料载体以截留合成微生物组、稳定菌群功能，同时如何利用自然界中的土著菌来实现预期目标也是未来的发展方向之一。

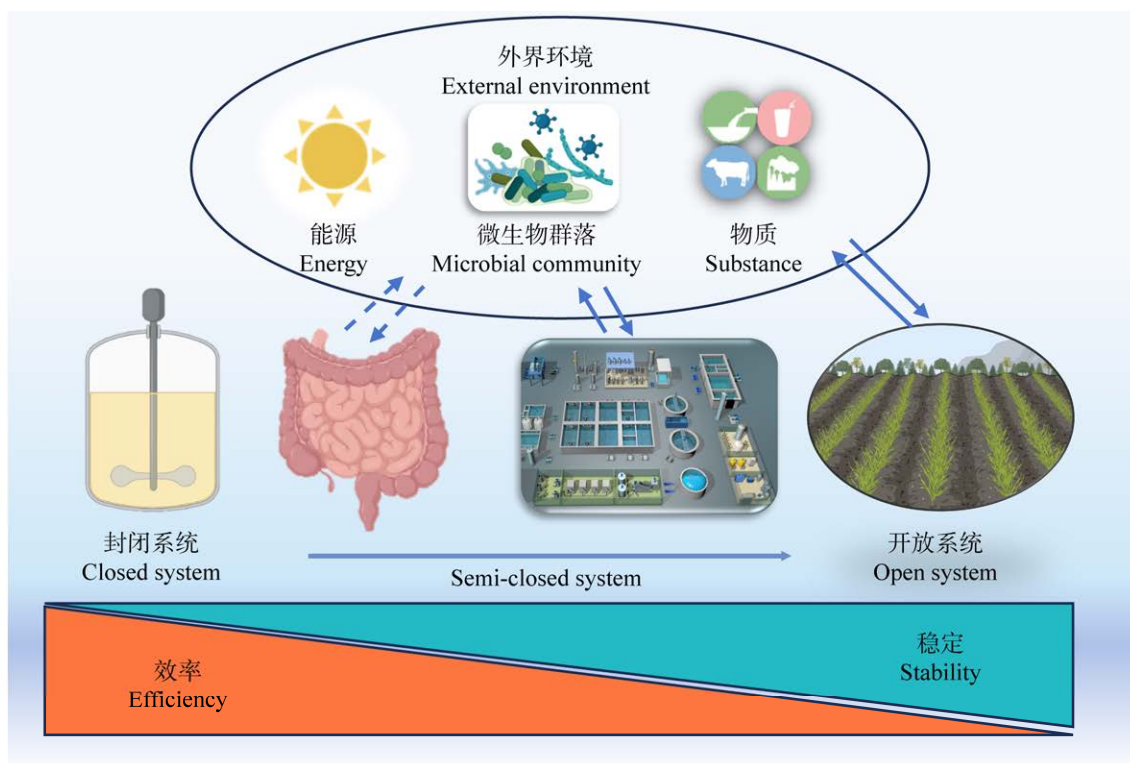


图3 不同应用场景微生物组构建策略的侧重与平衡

Figure 3 Emphasis and balance of microbiome construction strategies in different application scenarios.

总而言之，未来的微生物组工程将需要更加深入地理解菌种间的内在关系，发展更加精确的构建组装策略，以适应不同场景的应用需求。

REFERENCES

- [1] BLASER MJ, CARDON ZG, CHO MK, DANGL JL, DONOHUE TJ, GREEN JL, KNIGHT R, MAXON ME, NORTHEN TR, POLLARD KS, BRODIE EL. Toward a predictive understanding of earth's microbiomes to address 21st century challenges[J]. *mBio*, 2016, 7(3): e00714-16.
- [2] 刘炜伟, 吴冰, 向梅春, 刘杏忠. 从微生物组到合成功能菌群[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(4): 881-889. LIU WW, WU B, XIANG MC, LIU XZ. From microbiome to synthetic microbial community[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(4): 881-889 (in Chinese).
- [3] AGGARWAL N, KITANO S, PUAH GRY, KITTELMANN S, HWANG IY, CHANG MW. Microbiome and human health: current understanding, engineering, and enabling technologies[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(1): 31-72.
- [4] LAWSON CE, HARCOTMBE WR, HATZENPICHLER R, LINDEMANN SR, LÖFFLER FE, O'MALLEY MA, GARCÍA MARTÍN H, PFLEGER BF, RASKIN L, VENTURELLI OS, WEISSBRODT DG, NOGUERA DR, McMAHON KD. Common principles and best practices for engineering microbiomes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(12): 725-741.
- [5] 徐昭勇, 胡海洋, 许平, 唐鸿志. 人工合成微生物组的构建与应用[J]. *合成生物学*, 2021, 2(2): 181-193. XU ZY, HU HY, XU P, TANG HZ. Development and application of synthetic microbiome[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(2): 181-193 (in Chinese).
- [6] CLARK RL, CONNORS BM, STEVENSON DM, HROMADA SE, HAMILTON JJ, AMADOR-NOGUEZ D, VENTURELLI OS. Design of synthetic human gut microbiome assembly and butyrate production[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 3254.
- [7] 刘裕, 韦惠玲, 刘骥翔, 王少杰, 苏海佳. 人工多菌体系的设计与构建: 合成生物学研究新前沿[J]. *合成生物学*, 2021, 2(4): 635-650.

- LIU Y, WEI HL, LIU YX, WANG SJ, SU HJ. Design and progress of synthetic consortia: a new frontier in synthetic biology[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(4): 635-650 (in Chinese).
- [8] MABWI HA, KIM E, SONG DG, YOON HS, PAN CH, KOMBA EVG, KO G, CHA KH. Synthetic gut microbiome: advances and challenges[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 363-371.
- [9] HU HY, WANG MX, HUANG YQ, XU ZY, XU P, NIE Y, TANG HZ. Guided by the principles of microbiome engineering: accomplishments and perspectives for environmental use[J]. *mLife*, 2022, 1(4): 382-398.
- [10] PAN RZ, YANG XY, QIU M, JIANG WK, ZHANG WM, JIANG YJ, XIN FX, JIANG M. Construction of coculture system containing *Escherichia coli* with different microbial species for biochemical production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(8): 2208-2216.
- [11] ZHAO CH, SINUMVAYO JP, ZHANG YP, LI Y. Design and development of a “Y-shaped” microbial consortium capable of simultaneously utilizing biomass sugars for efficient production of butanol[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 111-119.
- [12] ZHOU K, QIAO KJ, EDGAR S, STEPHANOPOULOS G. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(4): 377-383.
- [13] JONES JA, VERNACCHIO VR, COLLINS SM, SHIRKE AN, XIU Y, ENGLAENDER JA, CRESS BF, McCUTCHEON CC, LINHARDT RJ, GROSS RA, KOFFAS MAG. Complete biosynthesis of anthocyanins using *E. coli* polycultures[J]. *mBio*, 2017, 8(3): e00621-17.
- [14] YAN W, GAO H, JIANG WK, JIANG YJ, LIN CSK, ZHANG WM, XIN FX, JIANG M. The *de novo* synthesis of 2-phenylethanol from glucose by the synthetic microbial consortium composed of engineered *Escherichia coli* and *Meyerozyma guilliermondii*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(12): 4018-4030.
- [15] WEI SY, GAO GR, DING MZ, CAO CY, HOU ZJ, CHENG JS, YUAN YJ. An engineered microbial consortium provides precursors for fengycin production by *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Natural Products*, 2024, 87(1): 28-37.
- [16] FENG J, LI RF, ZHANG SS, BU YF, CHEN YC, CUI YL, LIN BX, CHEN YH, TAO Y, WU B. Bioretrosynthesis of functionalized N-heterocycles from glucose *via* one-pot tandem collaborations of designed microbes[J]. *Advanced Science*, 2020, 7(17): 2001188.
- [17] de ROY K, MARZORATI M, van den ABEELE P, van de WIELE T, BOON N. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(6): 1472-1481.
- [18] XIAO CQ, CHI R, FANG YJ. Effects of *Acidiphilium cryptum* on biosolubilization of rock phosphate in the presence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2013, 23(7): 2153-2159.
- [19] BENOMAR S, RANAVA D, CÁRDENAS ML, TRABLY E, RAFRAFI Y, DUCRET A, HAMELIN J, LOJOU E, STEYER JP, GIUDICI-ORTICONI MT. Nutritional stress induces exchange of cell material and energetic coupling between bacterial species[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6283.
- [20] 陈伟, 陈芝, 文莹, 李季伦. 链霉菌遗传不稳定性研究进展与展望[J]. *微生物学报*, 2009, 49(10): 1271-1276.
- CHEN W, CHEN Z, WEN Y, LI JL. Overview and prospect on the genetic instability of *Streptomyces*: a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(10): 1271-1276 (in Chinese).
- [21] HEINKEN A, HERTEL J, ACHARYA G, RAVCHEEV DA, NYGA M, OKPALA OE, HOGAN M, MAGNÚSDÓTTIR S, MARTINELLI F, NAP B, PRECIAT G, EDIRISINGHE JN, HENRY CS, FLEMING RMT, THIELE I. Genome-scale metabolic reconstruction of 7 302 human microorganisms for personalized medicine[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(9): 1320-1331.
- [22] ZELEZNIAK A, ANDREJEV S, PONOMAROVA O, MENDE DR, BORK P, PATIL KR. Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(20): 6449-6454.
- [23] CAI JY, TAN TW, CHAN SHJ. Predicting Nash equilibria for microbial metabolic interactions[J]. *Bioinformatics*, 2021, 36(24): 5649-5655.
- [24] DUKOVSKI I, BAJIĆ D, CHACÓN JM, QUINTIN M, VILA JCC, SULHEIM S, PACHECO AR, BERNSTEIN DB, RIEHL WJ, KOROLEV KS, SANCHEZ A, HARCOMBE WR, SEGRÈ D. A metabolic modeling platform for the computation of

- microbial ecosystems in time and space (COMETS)[J]. *Nature Protocols*, 2021, 16(11): 5030-5082.
- [25] CONSORTIUM HMP. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome[J]. *Nature*, 2012, 486(7402): 207-214.
- [26] GENSOLLEN T, IYER SS, KASPER DL, BLUMBERG RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system[J]. *Science*, 2016, 352(6285): 539-544.
- [27] LEY RE, BÄCKHED F, TURNBAUGH P, LOZUPONE CA, KNIGHT RD, GORDON JI. Obesity alters gut microbial ecology[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(31): 11070-11075.
- [28] TURNBAUGH PJ, HAMADY M, YATSUNENKO T, CANTAREL BL, DUNCAN A, LEY RE, SOGIN ML, JONES WJ, ROE BA, AFFOURTIT JP, EGHOLM M, HENRISSAT B, HEATH AC, KNIGHT R, GORDON JI. A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 480-484.
- [29] LIÉVIN V, PEIFFER I, HUDAULT S, ROCHAT F, BRASSART D, NEESER JR, SERVIN AL. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity[J]. *Gut*, 2000, 47(5): 646-652.
- [30] TOURÉ R, KHEADR E, LACROIX C, MORONI O, FLISS I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(5): 1058-1069.
- [31] CHENG AG, HO PY, ARANDA-DÍAZ A, JAIN S, YU FB, MENG XD, WANG M, IAKIVIAK M, NAGASHIMA K, ZHAO AS, MURUGKAR P, PATIL A, ATABAKHSH K, WEAKLEY A, YAN J, BRUMBAUGH AR, HIGGINBOTTOM S, DIMAS A, SHIVER AL, DEUTSCHBAUER A, et al. Design, construction, and *in vivo* augmentation of a complex gut microbiome[J]. *Cell*, 2022, 185(19): 3617-3636.e19.
- [32] GOPALAKRISHNAN V, SPENCER CN, NEZI L, REUBEN A, ANDREWS MC, KARPINETS TV, PRIETO PA, VICENTE D, HOFFMAN K, WEI SC, COGDILL AP, ZHAO L, HUDGENS CW, HUTCHINSON DS, MANZO T, de MACEDO MP, COTECHINI T, KUMAR T, CHEN WS, REDDY SM, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients[J]. *Science*, 2018, 359(6371): 97-103.
- [33] BUFFIE CG, BUCCI V, STEIN RR, MCKENNEY PT, LING LL, GOBOURNE A, NO D, LIU H, KINNEBREW M, VIALE A, LITTMANN E, van den BRINK MRM, JENQ RR, TAUR Y, SANDER C, CROSS JR, TOUSSAINT NC, XAVIER JB, PAMER EG. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*[J]. *Nature*, 2015, 517(7533): 205-208.
- [34] 中华医学会肠外肠内营养学分会, 中国国际医疗保健促进交流会加速康复外科分会, 中国微生态治疗创新联盟, 上海预防医学会微生态专业委员会. 菌群移植标准化方法学的建立与临床应用中国专家共识[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2020, 23(S1): 5-13. Chinese Society for Parenteral and Enteral Nutrition, China International Healthcare Promotion and Exchange Association Accelerated Rehabilitation Surgery Branch, China Microecological Therapy Innovation Alliance, Microecology Professional Committee of Shanghai Preventive Medicine Association. Chinese experts consensus on standardized methodology and clinical application of fecal microbiota transplantation[J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2020, 23(S1): 5-13 (in Chinese).
- [35] ZUFFA S, SCHMID R, BAUERMEISTER A, GOMES PWP, CARABALLO-RODRIGUEZ AM, EL ABIEAD Y, ARON AT, GENTRY EC, ZEMLIN J, MEEHAN MJ, AVALON NE, CICHEWICZ RH, BUZUN E, TERRAZAS MC, HSU CY, OLES R, AYALA AV, ZHAO JQ, CHU H, KUIJPERS MCM, et al. microbeMASST: a taxonomically informed mass spectrometry search tool for microbial metabolomics data[J]. *Nature Microbiology*, 2024, 9(2): 336-345.
- [36] BEGUM N, WANG L, AHMAD H, AKHTAR K, ROY R, KHAN MI, ZHAO TJ. Co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and the plant growth-promoting rhizobacteria improve growth and photosynthesis in tobacco under drought stress by up-regulating antioxidant and mineral nutrition metabolism[J]. *Microbial Ecology*, 2022, 83(4): 971-988.
- [37] ZHOU X, WANG JT, LIU F, LIANG JM, ZHAO P, TSUI CKM, CAI L. Cross-Kingdom synthetic microbiota supports tomato suppression of *Fusarium* wilt disease[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 7890.
- [38] HE Y, YUN H, PENG L, JI J, WANG WX, LI XK. Deciphering the potential role of quorum quenching in efficient aerobic denitrification driven by a synthetic microbial community[J]. *Water Research*, 2024, 251: 121162.

- [39] WANG JJ, ZHAO SQ, XU S, ZHAO W, ZHANG XX, LEI Y, ZHAI HH, HUANG ZY. Co-inoculation of antagonistic *Bacillus velezensis* FH-1 and *Brevundimonas diminuta* NYM3 promotes rice growth by regulating the structure and nitrification function of rhizosphere microbiome[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1101773.
- [40] LI PF, DINI-ANDREOTE F, JIANG JD. Exploiting microbial competition to promote plant health[J]. *Trends in Plant Science*, 2024, 29(10): 1056-1058.
- [41] XU XH, ZARECKI R, MEDINA S, OFAIM S, LIU XW, CHEN C, HU SL, BROM D, GAT D, POROB S, EIZENBERG H, RONEN Z, JIANG JD, FREILICH S. Modeling microbial communities from atrazine contaminated soils promotes the development of biostimulation solutions[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(2): 494-508.
- [42] LIN ZY, ZHOU J, HE L, HE XJ, PAN ZL, WANG YM, HE Q. High-temperature biofilm system based on heterotrophic nitrification and aerobic denitrification treating high-strength ammonia wastewater: nitrogen removal performances and temperature-regulated metabolic pathways[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344: 126184.
- [43] 朋婷婷, 项兴佳, 冯有智, 何世颖, 吴宇澄, 张锋, 曾军, 林先贵. 磁性纳米颗粒介导分离技术筛选土壤中多氯联苯降解菌及其降解特性[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(9): 3771-3783.
- PENG TT, XIANG XJ, FENG YZ, HE SY, WU YC, ZHANG F, ZENG J, LIN XG. Magnetic nanoparticle-mediated isolation and degradation characterization of a PCB-degrading strain[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(9): 3771-3783 (in Chinese).
- [44] PANKE-BUISSE K, POOLE AC, GOODRICH JK, LEY RE, KAO-KNIFFIN J. Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(4): 980-989.
- [45] RUAN ZP, CHEN K, CAO WM, MENG L, YANG BG, XU MJ, XING YW, LI PF, FREILICH S, CHEN C, GAO YZ, JIANG JD, XU XH. Engineering natural microbiomes toward enhanced bioremediation by microbiome modeling[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 4694.
- [46] RAWAT P, SHARMA A, SHANKHDHAR D, SHANKHDHAR SC. Improvement of phosphorus uptake, phosphorus use efficiency, and grain yield of upland rice (*Oryza sativa* L.) in response to phosphate-solubilizing bacteria blended with phosphorus fertilizer[J]. *Pedosphere*, 2022, 32(5): 752-763.
- [47] GILMORE SP, LANKIEWICZ TS, WILKEN SE, BROWN JL, SEXTON JA, HENSKE JK, THEODOROU MK, VALENTINE DL, O'MALLEY MA. Top-down enrichment guides in formation of synthetic microbial consortia for biomass degradation[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(9): 2174-2185.