

海洋动物来源微生物分离培养的新方法

陈雷 毕洪玉 王婉莹 王光玉*

(哈尔滨工业大学(威海)海洋科学与技术学院生物工程系 山东 威海 264209)

摘要: 海洋动物体内有着丰富的微生物,它们可以帮助动物宿主合成一些营养物质或者抵御其他动物侵害所需的化合物。在海洋动物来源微生物的生物活性化合物中,目前已有功能较好且应用于临床治疗的化合物。由于实验室分离培养条件的限制,目前仅有小部分的微生物被分离利用。因此开展新颖而有效的海洋动物来源微生物分离培养方法的研究十分必要。本文概括了近些年从海洋动物中分离微生物的新方法的结果和不足,这些方法包括原位培养技术、电回收法和培养基的改良等,重点介绍了扩散盒技术、I-tip 技术和微囊包埋技术等。这些新方法的应用有助于获得更多新的微生物菌种和微生物次生代谢产物,了解微生物与动物宿主之间的关系,以及扩大海洋微生物资源的开发和利用。

关键词: 海洋动物, 微生物, 分离, 培养, 原位培养技术

Novel approaches for isolation and cultivation of microorganisms associated with marine animals

CHEN Lei BI Hong-Yu WANG Wan-Ying WANG Guang-Yu*

(Department of Bioengineering, School of Marine Science and Technology, Harbin Institute of Technology at Weihai, Weihai, Shandong 264209, China)

Abstract: Marine animals are rich in microorganisms, which can help animal hosts synthesize some nutrients for the growth of hosts or compounds against other animals. Many compounds isolated from these microorganisms have good bioactivities and some are used in clinical treatment. Only few microorganisms were isolated from marine animals in the common conditions. Therefore, novel and efficient approaches are urgently required to promote the isolation and cultivation of uncultured microbes from marine animals. In this review, we provide an overview of the novel cultivation-based approaches while documenting their outcomes and limitations, including *in situ* method for cultivating microorganisms, electrical retrieval method and the refinement of culture media, and

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31300009); Natural Scientific Research Innovation Foundation in Harbin Institute of Technology (HIT.NSRIF.2014127); Discipline Construction Guide Foundation in Harbin Institute of Technology at Weihai (WH20150204, WH20160205)

*Corresponding author: E-mail: wanggy18_2007@163.com

Received: March 17, 2018; **Accepted:** May 14, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 06, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31300009); 哈尔滨工业大学科研创新基金(HIT.NSRIF.2014127); 哈尔滨工业大学威海校区学科建设引导基金(WH20150204, WH20160205)

*通信作者: E-mail: wanggy18_2007@163.com

收稿日期: 2018-03-17; **接受日期:** 2018-05-14; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-06-06

focusing on diffusion growth chambers, I-tip method, and micro-encapsulation approach, etc. These new approaches may lead to valuable advances in obtaining more new microbial strains and novel secondary metabolites, understanding the relationship between microorganisms and animal hosts, and making use of marine microbial resources.

Keywords: Marine animal, Microorganism, Isolation, Cultivation, *In situ* method

海洋微生物因其独特的生存条件(高压、高盐、低光照及寡营养等)和新颖的活性次生代谢产物而成为天然产物研究的热点。在海洋动物体内存在着大量的微生物,这些共附生微生物可以帮助动物宿主合成一些重要的营养物质或者抵御其他动物侵害所需的化合物等^[1]。目前已经从海绵、海鞘和珊瑚等海洋动物中分离到种类丰富的微生物^[2-6]。多样性研究表明,分离到的原核微生物主要有厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、蓝细菌门和拟杆菌门等;真核微生物主要有浮霉菌门、子囊菌门和担子菌门等^[2-6]。海洋动物来源微生物可以合成很多具有生物活性的化合物,如聚酮类、萜类、生物碱、大环内酯类、肽类等,这些化合物具有抗微生物、抗肿瘤、抗污损和酶抑制剂等活性^[7-9]。近年来有直接或间接证据表明,一些最初从海洋动物中分离得到的具有生物活性的天然产物,其真正的生产者并不是动物本身,而是动物体内的微生物,例如已经应用于临床治疗的生物碱类化合物曲贝替丁(ET-743)和环肽类化合物 Didemnin B^[10]。

目前自然生态系统中只有不到 0.1%的微生物可以在实验室中获得纯培养^[11]。约 99%的微生物不能通过常规技术分离培养出来,这类微生物被称为“未培养微生物”。纯培养是对分离到的微生物物种的生理生化特性和应用潜力进行全面描述及评估的最有效的方法,且发展纯培养技术对未培养微生物资源的认识和开发将起着重要的作用^[12]。海洋动物来源微生物的分离培养有助于了解微生物与动物宿主之间的关系,获得新菌种和新颖的微生物次生代谢产物,以及扩大海洋微生物资源的开发利用。本文概括了近些年从海洋动物中分离微生物的新方法的结果和不足,这些方法包括原位培养技术、电回收法以及培养基改良等,重点介绍了扩散

盒技术、I-tip 技术和微囊包埋技术等。

1 常规分离培养方法

海洋动物种类繁多,已知的海洋动物约有 23 万种^[13]。生活在不同海洋环境的动物宿主为其共生的微生物提供了多样的生存环境,而海洋动物共生微生物的多样性是宿主与微生物之间相互选择和协同进化的结果^[14]。目前海洋动物来源微生物研究较多的有海绵、海鞘和珊瑚等。

海洋动物来源微生物的分离一般是采用平板分离法。将海洋动物样品在实验室中用无菌海水或者乙醇冲洗后,用灭菌的镊子和剪刀将动物样品剪成小块,研磨至匀浆后进行梯度稀释,然后涂布在含有不同营养成分的固体培养基平板上进行微生物的分离培养^[15-19]。还有将海洋动物样品干燥后研成粉末,然后采用印章涂布法将粉末涂布于相应的固体培养基上进行微生物的分离培养^[20]。平板分离法操作简单,但获得微生物的种类相对较少,还有大量的“未培养微生物”有待研究。这种方法的局限性主要是:无法模拟海洋的环境条件,如高压;氧化毒性,如生长较快的微生物在生长代谢过程中产生的过氧化物、自由基和超氧化物等,对生长较慢微生物的毒害作用;缺失某些微量的营养物质;可能破坏了自然环境中生物体之间重要的细胞间通讯^[21-24]。

2 分离培养新技术

2.1 原位培养技术

在实验室条件下由于无法全面掌握微生物原位生长的环境信息,或无法模拟自然环境条件,使得大量微生物未培养,严重制约了对环境微生物的开发和利用^[25]。原位培养技术可以使微生物在原生生态环境中获得天然的营养物质、信号分子或其他生

长因子, 最终被分离出来获得培养, 将“未培养微生物”转变为可以培养的新菌种而加以研究。

2.1.1 扩散盒技术

2014 年, Steinert 等^[26]使用扩散盒技术(Diffusion growth chambers, DGC)分离海绵(*Rhabdastrella globostellata*)中的细菌。他把两个微型过滤器粘在一起组合成扩散盒, 过滤器的两侧有 0.2 μm 滤膜, 可以允许营养物和废物的进出。向扩散盒中加入冷却的培养基和海绵匀浆液, 其中培养基的种类包括低、中、高营养成分的培养基以及加入海绵提取液的 M1 培养基。然后在每个海绵组织约 5 cm 深的切口处放入 3 个扩散盒, 原位培养 4 周后, 将扩散盒从海绵组织中取出并带回实验室。试验共获得 255 个菌株的 16S rRNA 基因序列, 它们分属于 α -和 γ -变形杆菌门、拟杆菌门、放线菌门和厚壁菌门, 其中有 15 个序列为拟杆菌门和变形杆菌门的新种, 取得了较好的分离效果^[26]。但是将扩散盒放入海绵体内, 仍然不能 100%地还原海绵的自然生长状态, 进而会影响海绵体内相关微生物的生长; 其次该试验原位培养的扩散盒需要 5 cm 的切割口, 因此需要体积足够大的海绵, 所以不能广泛应用于所有海绵以及其他体积较小的海洋动物中。本课题组在个体较大的短腹海鞘(*Aplidium* sp.)中使用这项技术分离海鞘中的微生物, 向扩散盒中加入冷却的海洋琼脂等培养基和海鞘匀浆液, 将扩散盒放入海鞘体内进行原位培养。由于短腹海鞘在切割后伤口的自愈能力较差, 使得动物的存活时间缩短, 虽然只进行了 1 周的原位培养, 但是还是获得了比直接涂布法更多的微生物(文章未发表)。

2.1.2 I-tip 技术

I-tip 技术就是用移液枪枪头进行原位培养(*In situ* cultivation by tip)的简称, 是 Jung 等^[27] 2014 年在研究海绵中微生物多样性时使用的技术。在实验室常用的 200 μL 移液枪枪头中, 将酸洗后的玻璃珠填充在底部的尖端处, 以防止较大生物体的进入, 并加入 70 μL 含有 0.7%琼脂的灭菌培养基以供微生物生长。使用两种尺寸的玻璃珠进行微生物的选择

性分离: 小玻璃珠的直径为 60 μm –100 μm ; 较大的玻璃珠的直径为 150 μm –212 μm 。移液枪枪头较宽的顶部用防水胶无菌密封, 以防止空气和水对吸头内部的污染。在水族箱中培养海绵, 将 20 个 I-tip 分别插入每个海绵样品的各个部位, 插入深度为 1.5 cm, 并且每隔 48 h 检查其插入情况。培养 4 周后, 从每个水族箱中取出海绵和 I-tip。将收集的 I-tip 宽端用刀片无菌切割, 然后用无菌的接种环取出长有微生物的琼脂培养基。将琼脂培养基加入到 1 mL 无菌 PBS 缓冲溶液中, 剧烈混合, 并接种在 R2A 琼脂平板上, 在 10 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 周。同时采用常规的稀释涂布法分离海绵来源的微生物用于对比。结果表明, I-tip 法分离到 5 个门(厚壁菌门、 α -变形菌门、 β -变形菌门、 γ -变形菌门和放线菌门)的 34 种细菌, 而常规的培养法只得到了 3 个门(厚壁菌门、 β -变形菌门和 γ -变形菌门)的 16 种细菌^[27]。

I-tip 法模仿自然条件实现原位培养, 使得环境中一些生长活跃的菌株得到很好地分离; 可以有效地缩小可培养和不可培养细菌之间的差距, 使得一些与宿主动物关系密切的菌株得到很好的分离。虽然这个方法使用的是贝加尔湖中的淡水海绵, 但是由于海绵动物结构的相似性, 在海水海绵的微生物分离培养中也可以使用这个方法。I-tip 技术采用的半固态培养基(添加 0.7%琼脂的培养基)提供了大量的氧浓度, 满足了微量需氧细菌的需求; 其次采用的 200 μL 移液枪枪头克服了上述扩散生长室(DGC)体积较大无法应用于一些体积较小的海洋动物的缺点。I-tip 法也存在一定的局限性, 如只能将枪头的最尖端 1.5 cm 插入海绵样品中, Tip 头仍有很大一部分留在外面, 因此需要进行固定, 否则无法应用在流动的海水中。

2.1.3 微包埋法

微包埋法是采用物理化学等方法将海洋微生物细胞包裹于通透性良好且允许氧气、营养物质和代谢产物等自由进出的天然高分子材料中。其中微球制备技术是关键, 因为微球的质量直接影响着后续试验的结果。目前包埋海洋微生物的微球制备法

主要包括水油乳化法、膜乳化法、挤出法以及微流体法等^[28]。根据包埋所用介质的不同,又分为海藻酸钠包埋法、聚乙烯醇包埋法、丙烯酰胺包埋法、明胶包埋法、卡拉胶包埋法以及两种或两种以上介质的组合包埋法^[29]。可根据实际情况选择不同包埋介质,对于微生物的包埋要选用对微生物损伤小且稳定性好、毒性小且抗微生物分解性强的介质。海藻酸钠包埋法一般通过 Ca^{2+} 固化获得海藻酸钙微球,由于其具有良好的通透性且固化过程简单易行的优点已广泛应用于包埋细菌、真菌等领域。但海藻酸钙微球还存在机械强度较低,表面孔隙尺寸较大等缺陷^[30]。袁东芳在海藻酸钙微球制作过程中加入聚乙烯醇[Poly(vinyl alcohol), PVA]制成混合微球,并对海藻酸钙微球和海藻酸钙-PVA 混合微球进行了环境中海洋微生物的包埋培养试验,发现海洋微生物在海藻酸钙微球中生长较快,在混合微球中生长较慢;但由于混合微球的机械强度较强,可用于长时间培养海洋微生物,有望培养出更多未培养的寡营养的海洋微生物^[30]。

Ben-Dov 等使用双层微包埋法(Double encapsulation technique)研究珊瑚(*Fungia granulosa*)黏液层中的细菌。将珊瑚的黏液进行 10 倍系列稀释,以 1:1 的比例与温热的高压灭菌的琼脂混合制成球体,然后将小球装入聚砜膜中,并放入珊瑚的黏液层中进行原位培养。包埋在小球内部的细菌可以通过双层膜从珊瑚中获取必需的营养物质和一些信号分子来促进其生长。最后从这些双层微包埋的小球中检测到的 16S rRNA 基因序列仅有 50% 与已知的序列相似,相似度仅为 85%–96%^[31]。这项技术为获取未知微生物多样性的研究提供了新方法。双层微包埋法中小球的体积小、结构坚固以及聚砜膜的选择渗透性等特点使其在自然环境(水生和陆地)和实验室中的培养操作切实可行。但这种方法也存在一定的局限性,如操作较为复杂,对聚砜涂层包埋琼脂球的韧性质量要求较高,且菌液的稀释程度影响包埋在琼脂球中细菌的生长状况。

2.2 电回收法

Koyama 等^[32]使用氧化铟锡/玻璃(Indium tin oxide/glass, ITO)电极,通过控制电势的方法使活的微生物在电极表面发生吸附和解吸附过程,从深海沉积物中分离到大量的细菌。2015 年, Koyama 等^[33]进一步开发了电回收法(Electrical retrieval method, ER)分离冷冻海绵样品中的微生物。具体做法是,将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存的海绵样品取出,放在冰的人工海水中解冻 2 h;使用 70%的乙醇和 3 种抗生素进行消毒,然后在冰上将海绵样品切成小块并加入无菌的人工海水,在冰上冷却后放入 58.5 cm^2 的大型电极室装置中。在 $9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的人工海水中,将相对于 Ag/AgCl 参比电极 -0.3 V 的恒电势施加于氧化铟锡/玻璃(Indium tin oxide/glass, ITO)或掺镓氧化锌/玻璃(Gallium-doped zinc oxide/glass, GZO)的工作电极上 2 h,使得海绵中的微生物吸附到工作电极上。用人工海水洗涤电极室,然后用相对于 Ag/AgCl 参比电极 $\pm 20\text{ mV}$ 的正弦波电势(9 MHz)施加于工作电极上 20 min,使得微生物从工作电极上解吸附到人工海水中。结果从 2 种海绵(*Spirastrella insignis* 和 *Callyspongia confoederata*)样品中共分离到 32 个门 72 个纲的细菌和 3 种古细菌。电回收法可以通过对电势的优化试验,找到最优波形、最优共振频率、最佳振幅、最佳时长等条件,有效地去除一些不必要的微生物,进而分离到环境中稀有的微生物^[33]。电回收法虽然操作较为复杂,但为海洋动物来源微生物的分离提供了新思路。

3 海洋动物分离培养基的改良

3.1 寡营养培养基的使用

寡营养培养基的使用可以增加海洋动物微生物分离的种类和数量。Xi 等对从中国南海和黄海收集到的 8 种海绵进行可培养放线菌的分离,经过 30–60 d 的培养共得到 327 个菌株;其中 108 株菌的 16S rRNA 基因测序结果显示,它们属于 10 个科中的 13 个属,其中寡营养的 M5(海水琼脂)培养基分离到的菌株数量最多^[34]。2017 年 Buedenbender

等使用 5 种培养基研究 3 种澳大利亚海鞘(*Symplegma rubra*、*Aplidium solidum* 和 *Polyclinum vasculosum*) 中可培养放线菌的多样性,共分离到 120 株放线菌,其中淀粉酪素培养基(Starch casein agar, SCA)分离到的菌株数量最多为 60 株,它和淀粉培养基(Starch agar, SA)分离到的放线菌主要是小单孢菌属(*Micromonospora*);玉米淀粉培养基(Corn starch, CS)分离到的菌株多样性最好,分离到的菌株主要是链霉菌属(*Streptomyces*)^[35]。

3.2 培养基中抗氧化剂的使用

微生物生长代谢过程中会产生过氧化物等有害物质,因此可在培养基中加入具有抗氧化的酶制剂和化合物,如过氧化氢酶、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、丙酮酸钠、 α -酮戊二酸等,使一些非培养微生物恢复活性而获得培养。Olson 等在一组营养成分由低到高的固体培养基中使用过氧化氢酶、丙酮酸钠和两者的组合,研究它们对海绵(*Discodermia* sp.)样品中微生物的恢复情况。试验结果显示,在培养基中添加抗氧化剂之后,有 35% 平板上的菌落形成单位(Colony forming unit, CFU)的恢复程度比未添加的对照培养基高出 50% 或更多,有 21% 平板上的恢复率甚至超过了 100%;丙酮酸钠单独使用或者与过氧化氢酶联合使用对海绵动物中微生物的恢复效果最好^[36]。

3.3 海洋动物组织的添加

海洋动物宿主可以为体内微生物的生存提供多种营养成分;而微生物在体外培养时,只能从培养基中获得有限的营养成分。因此可以通过在分离培养基中添加海洋动物的提取液或研磨液以及干粉等方式来模拟海洋动物体内的微环境,有利于微生物的生长,提高微生物的获得率^[37]。Webster 等^[38]研究了海绵(*Rhopaloeides odorabile*)中细菌的多样性,分别使用添加海绵组织的水滤液、有机溶剂提取物以及研磨液的培养基,分离到 42 株以前未从这种海绵中分离培养的细菌。16S rRNA 基因序列分析表明,分离到的细菌属于假诺卡氏菌属

(*Pseudonocardia*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和其他未被培养过或未被鉴定过的细菌^[38]。信艳娟等根据繁茂膜海绵(*Hymeniacidon perlevis*)的元素组成配制微量元素溶液,加入到放线菌分离培养基,同时将部分培养基稀释成寡营养培养基,共获得可培养放线菌 59 株。通过形态和颜色观察将其归为 27 个类群,16S rRNA 基因测序结果表明其中 15 株属于稀有放线菌中的 9 个属^[39]。崔迪在研究威海海域海鞘来源可培养细菌时发现,添加了海鞘干粉的高氏 1 号培养基可以增加分离细菌的数量^[40]。

3.4 培养基中抑菌剂的使用

海洋动物中存在多种微生物,其中细菌和真菌较容易分离,而分离到的放线菌的种类和数量相对较少。在分离培养基中加入重铬酸钾、制霉菌素、放线菌酮、青霉素或萘啶酸等抗生素可以有效地抑制真菌或细菌的生长,以便分离到更多的放线菌。2015 年 Sun 等在分离培养基中加入萘啶酸(15 $\mu\text{g/mL}$)和重铬酸钾(50 $\mu\text{g/mL}$),从 15 种南海海绵中分离到 77 个放线菌菌株,基于 16S rRNA 基因序列分析表明,它们属于 12 个科中的 20 个属,其中有 3 种属(*Marihabitans*、*Polymorphospora* 和 *Streptomonospora*)为首次从海洋海绵中分离到的稀有放线菌属^[41]。前面提到的 Buedenbender 等在分离 3 种澳大利亚海鞘中放线菌时,在每种分离培养基中都添加了放线菌酮(50 $\mu\text{g/mL}$)和制霉菌素(50 $\mu\text{g/mL}$)来抑制真菌的生长,添加萘啶酸(25 $\mu\text{g/mL}$)来抑制非放线菌细菌的生长,共分离到 120 株放线菌,取得了较好的效果^[35]。

4 问题和展望

近些年来应用微生物分离培养的新技术,研究者们获得了更多海洋动物来源的微生物,为海洋微生物资源的开发和利用提供有力支持。但是与海水和海洋沉积物样品相比,海洋动物的研究还远远不够。目前海洋动物来源微生物的分离培养仍然存在很多问题:(1) 已研究的海洋动物种类较少。现在

海洋动物体内微生物多样性的研究主要集中在无脊椎动物(如海绵)、脊索动物(如海鞘)和脊椎动物(如鱼类)等。还有大量的海洋动物中的微生物没有获得分离和利用。(2) 针对海洋动物设计的培养基种类较少。目前大多是借用海水或海洋沉积物中微生物分离的培养基,而环境样品与活体动物能够为微生物提供的营养成分有着很大的区别,这可能是制约海洋动物共附生微生物难以获得纯培养的一个主要原因。(3) 海洋动物来源微生物分离时采用的胶凝剂较为单一,实验室中最常使用的是琼脂。在陆地和海洋环境微生物的研究中,还有黄原胶、结冷胶、卡拉胶、伊果戈和瓜尔胶等得以使用。Rygaard 等^[42]研究发现结冷胶代替常用的琼脂作为胶凝剂能够促进某些被琼脂抑制的微生物的生长。因此在海洋动物微生物的分离培养基的配置时可以尝试使用不同的胶凝剂以及不同浓度的胶凝剂。(4) 培养条件:海洋动物体内多是兼性厌氧或厌氧的微生物,而实验室的常规分离培养法主要是针对好氧微生物。因此要改善实验室的条件,逐步增加对海洋动物体内厌氧或兼性厌氧微生物的研究,才能进一步揭示微生物的多样性。(5) 海洋动物样品分离时的预处理方法有限。可以通过适度的热处理来减少非放线菌细菌的数量并且诱发某些放线菌孢子的萌发,增加放线菌的出菌率^[43-44]。(6) 培养时间:对于一些生长缓慢的海洋动物来源微生物,可以通过适当延长培养时间来增加出菌率。考虑到实验室的实际条件(如易污染、培养基水分蒸发等),培养时间也不能无限期的延长。

当前,专门针对海洋动物中微生物分离培养的新技术还比较有限。但可以借鉴一些其他来源微生物的分离培养新技术应用于海洋动物共附生微生物的研究。如阵列液滴微流控技术,可实现高通量微生物单细胞的分离和培养。Dong 等设计了用于从纯培养或混合物中自动分离和培养趋化性微生物的微流体装置^[45]。该装置由两部分组成:第一部分是建立在通道上的浓度梯度化学反应器以诱导运动微生物的趋化性;第二部分是从样本中分离趋

化细胞,然后与培养基混合形成液滴用于微生物的包埋、培养、计数和回收,并开发了自动程序,用于将带有微生物的液滴随后在琼脂平板上进行放大培养。试验结果表明这种设备可以不必依赖于荧光标记而广泛用于趋化性研究,以及从各种环境中分离功能性微生物物种^[45]。因此可以尝试将该技术应用用于海洋动物中功能性微生物的分离。

此外,在研究海洋动物中微生物的分离培养时,可以采用多种技术与纯培养方法相结合的策略。如可以先采用宏基因组学方法了解海洋动物样本中全部微生物的多样性,这一结果不仅可以与纯培养法的结果相比较;还可以用于指导“未培养微生物”的分离。通过比较,找到那些未能被分离培养微生物的菌种类型,根据以往研究的生理生化特征,进行相应分离策略的设计,如添加特殊营养成分的培养基、特殊的样品预处理、改变培养条件、模拟自然生存环境以及微生物群体培养等方法,最终使更多的“未培养微生物”获得纯培养和加以研究利用。

REFERENCES

- [1] Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria[J]. *Natural Product Reports*, 2009, 21(4): 519-538
- [2] Blockley A, Elliott DR, Roberts AP, et al. Symbiotic microbes from marine invertebrates: driving a new era of natural product drug discovery[J]. *Diversity*, 2017, 9(4): 49
- [3] Laport MS, Bauwens M, de Oliveira Nunes S, et al. Culturable bacterial communities associated to Brazilian *Oscarella* species (Porifera: Homoscleromorpha) and their antagonistic interactions[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(4): 489-499
- [4] Naik OA, Shashidhar R, Rath D, et al. Characterization of multiple antibiotic resistance of culturable microorganisms and metagenomic analysis of total microbial diversity of marine fish sold in retail shops in Mumbai, India[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(7): 6228-6239
- [5] Rodrigues GN, Alvarenga N, Vacondio B, et al. Biotransformation of methyl parathion by marine-derived fungi isolated from ascidian *Didemnum ligulum*[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2016, 7: 24-30
- [6] Xu W, Guo SS, Gong LF, et al. Phylogenetic survey and antimicrobial activity of cultivable fungi associated with five scleractinian coral species in the South China Sea[J]. *Botanica Marina*, 2018, 61(1): 75-84
- [7] Palanisamy SK, Rajendran NM, Marino A. Natural products diversity of marine ascidians (tunicates; ascidiacea) and successful drugs in clinical development[J]. *Natural Products*

- and Bioprospecting, 2017, 7(1): 1-111
- [8] Viju N, Satheesh S, Punitha SMJ. Antifouling activities of antagonistic marine bacterium *Pseudomonas putida* associated with an octopus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2017, 87(4): 1113-1124
- [9] Habener LJ, Hooper JNA, Carroll AR. Chemical and biological aspects of marine sponges from the family *Mycalidae*[J]. Planta Medica, 2016, 82(9/10): 816-831
- [10] Chen L, Fu CM, Wang GY. Microbial diversity associated with ascidians: a review of research methods and application[J]. Symbiosis, 2017, 71(1): 19-26
- [11] Ravin NV, Mardanov AV, Skryabin KG. Metagenomics as a tool for the investigation of uncultured microorganisms[J]. Russian Journal of Genetics, 2015, 51(5): 431-439
- [12] Xiong ZQ. Bioprospecting of uncultured microorganisms: the dawning of antibiotic discovery[J]. Clinical Microbiology: Open Access, 2016, 5: e132
- [13] Li YQ, Lu YY, Xing YY, et al. Recent progress in research on bioactive substances from marine animals[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2015, 39(12): 905-914 (in Chinese)
李艳青, 陆园园, 邢莹莹, 等. 海洋动物来源活性物质的研究新进展[J]. 药学进展, 2015, 39(12): 905-914
- [14] Li FF, Lu SS, Ji TF, et al. Advances in secondary metabolites produced by actinobacteria derived from animal-microbe mutualism and their biological activities[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2017, 52(7): 1091-1101 (in Chinese)
李芳芳, 陆盛胜, 吉腾飞, 等. 动物来源放线菌的次级代谢产物及其生物活性研究进展[J]. 药学学报, 2017, 52(7): 1091-1101
- [15] Li GJ, Liu JS, Li BY, et al. New methods and techniques for the isolation and culture of microorganisms[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2009(11): 10-11 (in Chinese)
李国娟, 柳纪省, 李宝玉, 等. 微生物分离与培养的新方法与新技术[J]. 畜牧兽医科技信息, 2009(11): 10-11
- [16] Handayani D, Rustini OR. Antimicrobial activity screening of symbiotic fungi from marine sponge *Petrosia nigrans* collected from south coast of west Sumatera, Indonesia[J]. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 2016, 8(4): 623-626
- [17] Sahnouni F, Matallah-Boutiba A, Chemlal D, et al. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of marine fish in the Oran Algeria coast[J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(13): 3125-3133
- [18] Laport MS, Bauwens M, Collard M, et al. Phylogeny and antagonistic activities of culturable bacteria associated with the gut microbiota of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*)[J]. Current Microbiology, 2018, 75(3): 359-367
- [19] Deatraksa J, Sunthornthummas S, Rangsiruji A, et al. Isolation of folate-producing *Weissella* spp. from Thai fermented fish (Pla Som Fug)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 89: 388-391
- [20] Ma L, Zhang WJ, Zhu YG, et al. Isolation of actinobacteria with antibiotic activity associated with soft coral *Nephthea* sp.[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(10): 1063-1071 (in Chinese)
马亮, 张文军, 朱义广, 等. 永兴岛白穗软珊瑚共附生放线菌筛选及部分活性次级代谢产物的鉴定[J]. 微生物学报, 2013, 53(10): 1063-1071
- [21] Joint I, Mühling M, Querellou J. Culturing marine bacteria-an essential prerequisite for biodiscovery[J]. Microbial Biotechnology, 2010, 3(5): 564-575
- [22] Zhang XM, Zhang XH. New culture approaches of marine microorganisms[J]. Marine Sciences, 2009, 33(6): 99-104 (in Chinese)
张秀明, 张晓华. 海洋微生物培养新技术的研究进展[J]. 海洋科学, 2009, 33(6): 99-104
- [23] Manome A, Zhang H, Tani Y, et al. Application of gel microdroplet and flow cytometry techniques to selective enrichment of non-growing bacterial cells[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 197(1): 29-33
- [24] Giovannoni SJ, Foster RA, Rappé MS, et al. New cultivation strategies bring more microbial plankton species into the laboratory[J]. Oceanography, 2007, 20(2): 62-69
- [25] Fan NS, Qi R, Yang M. Current technical progresses in the cultivation for uncultured microorganism[J]. Chinese Journal of Applied and 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
- [26] Steinert G, Whitfield S, Taylor MW, et al. Application of diffusion growth chambers for the cultivation of marine sponge-associated bacteria[J]. Marine Biotechnology, 2014, 16(5): 594-603
- [27] Jung D, Seo EY, Epstein SS, et al. Application of a new cultivation technology, I-tip, for studying microbial diversity in freshwater sponges of Lake Baikal, Russia[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 90(2): 417-423
- [28] 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
- [29] 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
- [30] Yuan DF. The preparation of alginate microspheres and alginate-PVA microspheres and microencapsulation of marine microorganisms[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 (in Chinese)
袁东芳. 海藻酸钙微球和海藻酸钙-PVA 微球的制备及对海洋微生物的包埋培养[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2014

- [31] 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
- [32] Koyama S, Konishi MA, Ohta Y, et al. Attachment and detachment of living microorganisms using a potential-controlled electrode[J]. Marine Biotechnology, 2013, 15(4): 461-475
- [33] Koyama S, Nishi S, Tokuda M, et al. Electrical retrieval of living microorganisms from cryopreserved marine sponges using a potential-controlled electrode[J]. Marine Biotechnology, 2015, 17(5): 678-692
- [34] Xi LJ, Ruan JS, Huang Y. Diversity and biosynthetic potential of culturable actinomycetes associated with marine sponges in the China seas[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(5): 5917-5932
- [35] Buedenbender L, Carroll AR, Ekins M, et al. Taxonomic and metabolite diversity of actinomycetes associated with three Australian ascidians[J]. Diversity, 2017, 9(4): 53
- [36] Olson JB, Lord CC, McCarthy PJ. Improved recoverability of microbial colonies from marine sponge samples[J]. Microbial Ecology, 2000, 40(2): 139-147
- [37] Abdelmohsen UR, Pimentel-Elardo SM, Hanora A, et al. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes[J]. Marine Drugs, 2010, 8(3): 399-412
- [38] Webster NS, Wilson KJ, Blackall LL, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 434-444
- [39] Xin YJ, Wu PC, Deng MC, et al. Phylogenetic diversity of the culturable rare actinomycetes in marine sponge *Hymeniacidon perlevis* by improved isolation media[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(7): 859-866 (in Chinese)
- 信艳娟, 吴佩春, 邓麦村, 等. 繁茂膜海绵中可培养稀有放线菌的多样性[J]. 微生物学报, 2009, 49(7): 859-866
- [40] Cui D. Diversity of bacteria associated with ascidians from Weihai and screening of strains with bioactivities[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2014 (in Chinese)
- 崔迪. 威海海域海鞘来源可培养细菌多样性和活性菌株筛选[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2014
- [41] Sun W, Zhang FL, He LM, et al. Actinomycetes from the South China Sea sponges: isolation, diversity, and potential for aromatic polyketides discovery[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6(148): 1048
- [42] Rygaard AM, Thøgersen MS, Nielsen KF, et al. Effects of gelling agent and extracellular signaling molecules on the culturability of marine bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(9): e00243-17
- [43] Karuppiiah V, Li YX, Sun W, et al. Functional gene-based discovery of phenazines from the actinobacteria associated with marine sponges in the South China Sea[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(14): 5939-5950
- [44] Cheng C, Macintyre L, Abdelmohsen UR, et al. Biodiversity, anti-trypanosomal activity screening, and metabolomic profiling of actinomycetes isolated from Mediterranean sponges[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0138528
- [45] Dong LB, Chen DW, Liu SJ, et al. Automated chemotactic sorting and single-cell cultivation of microbes using droplet microfluidics[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24192