

Progress on the Research Pertinent to Cultivation Constraint Factors and Improved Cultivation Methods of Environmental Uncultured Microorganisms

Lichun Niu, Yufang Sun, Tianqi Zhao, Fuqiang Song*

Laboratory of Restoration Ecology, School of Life Science, Heilongjiang University, Harbin
Email: 0431sfq@163.com

Received: Apr. 30th, 2014; revised: May 28th, 2014; accepted: Jun. 3rd, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

A great deal of unique uncultured microorganisms exist in various kinds of habitats; they benefit humans but are difficult to be purely cultured and are rich in species diversity, playing a very important role on the matter cycle of the whole earth and life sustainability. The uncultured microorganisms as well as the factors attributing to their currently uncultured feature were briefly introduced in this review, and subsequently novel methods and improved measurements for isolating them were highlighted. Currently, novel medium containing microorganism recovery promoting factors was designed through simulating maintaining the relationships among microbes under natural conditions. Combination of a variety of proven technologies is employed to make the pure culture possible of uncultured microorganisms, which play a promoting role on the development of microbiological field.

Keywords

Uncultured Microorganisms, Limiting Factors, Culture Method

未培养微生物的限制因素及培养方法研究进展

牛丽纯, 孙玉芳, 赵天琦, 宋福强*

*通讯作者。

黑龙江大学修复生态研究室, 哈尔滨
Email: 0431sfq@163.com

收稿日期: 2014年4月30日; 修回日期: 2014年5月28日; 录用日期: 2014年6月3日

摘要

自然生境中存在许多独特的对人类有益却难以纯培养的未培养微生物, 这些微生物蕴含着丰富的物种多样性, 在整个地球上的物质循环和生命持续中占有重要的角色。本文简要介绍了未培养微生物以及目前不可将其分离培养的影响因素, 重点阐述了未培养微生物分离培养的新颖方法和改进措施, 在模拟自然条件维持微生物间相互关系的前提下, 设计出促进微生物复苏因子的新型培养基, 采用多种行之有效的技术相结合, 使未培养微生物的纯培养成为可能, 这对以后微生物领域的发展可以起到助推作用。

关键词

未培养微生物, 限制因素, 培养方法

1. 引言

在环境微生物的研究中, 目前被记录的可培养的原生生物仅仅只有 5000 多种, 就连权威的 Bergey[1] 氏手册中也只是记录了 3100 种。微生物可培养性约海水中为 0.001%~0.1%, 淡水中约为 0.25%, 土壤中约为 0.3%, 活性污泥中约为 1%~15% 左右。可见, 环境中绝大多数微生物难以被标准实验室的方法复苏和培养, 这样的微生物被称为未培养微生物或称为不可培养微生物(uncultured microorganism)[2]。

未培养微生物在环境微生物群落中占有很高的百分比, 无论是其物种的类群, 还是新陈代谢途径、生理生化反应及其代谢产物等, 都存在着不同程度的新颖性和丰富的多样性, 因而在对其研究中势必蕴涵着巨大的生物资源。传统纯培养技术不能研究那些难以在实验室条件下生存的微生物, 从而不能反映自然界微生物多样性的丰度和范畴, 使得微生物多样性资源这个巨大宝库也难以得到全面的开发和利用[3]。对未培养微生物进行广泛深入的研究, 不仅是微生物学基础理论研究的需求, 也是对未培养微生物资源开发利用的基础。研究未培养微生物可以克服传统纯培养技术的不足, 还是一条探知未培养微生物、寻找新基因及其产物的新途径, 开启了我们认识微生物多样性和获得新资源的大门。

2. 制约未培养微生物生长的因素

2.1. 微生物生长缓慢不易检测

自然界中许多微生物之间有共生、互生等关系, 将其从生态平衡的环境中转入人为的条件培养时, 原来的平衡会被破坏, 在适合条件下将这些微生物接种至培养基, 适合生长的微生物由于生长快而占据优势地位, 大量摄取培养基中有限的营养成分, 使生长缓慢的微生物得不到充足的营养受到抑制; 有些生长缓慢的微生物在平皿上形成只有很少细胞聚集的微小菌落, 不能长成肉眼可见的菌落; 某些微生物即使能在低浓度营养条件下生长, 但是必须在特定的培养条件下才可以; 还有一类生存在寡营养环境下的微生物在培养基中不能形成菌落, 仅形成几个细胞组成的小型集合。一个菌落中细胞的数目至少为 10⁵ 个才能用肉眼观察到, 而那些生长速度较慢、其生长达不到高密度的细菌种类, 在培养基上用肉眼是看不到菌落的[4], 从而导致这些微生物的生长不被发觉, 表现为“未培养”。

想检测到这类未培养微生物，使用常规的方法比如比浊法和计数法等都无法实现。现在较成熟的方案是借助特殊的仪器设备：显微操作仪、微毛细管或光学镊子等单细胞分离技术，可以从微生物群落中鉴定出目的细胞。这样就可以避免由于某些微生物数量少、生长受其他微生物抑制或生长缓慢等因素导致的“不可培养性”。但是这些技术均需要严格的实验培养条件，由于对目的微生物细胞代谢认识不足，以致于无法掌握适宜微生物生长的决定因素。另一方面，由于缺乏清晰直接的形态学特征也很难在一个复杂的微生物群体中鉴定出需要的目的细胞。

2.2. 营养成分过高的培养基

在自然界中的微生物大部分是以中低营养甚至是寡营养方式生活的。常规纯培养对这种认识不充分，当这种状态的微生物被转移到富营养但营养元素种类少的培养基上时，会导致生长环境的差距太大[5]。实验室中通常将需要寡营养的微生物纯菌种置于丰富的营养环境中，希望达到微生物快速生长和最大生物产量，微生物早期会快速生长，但同时产生大量的、微生物自身难以调节的“毒性氧物质”即大量过氧化物、自由基和超氧化物，该类物质快速、过量的积累会破坏微生物细胞的内膜结构，由此产生一些应激机制如 SOS 来修复微生物[6]，未及时修复的微生物将会死亡或表现为不可培养[7]。另外，混合微生物在人工培养基上好氧条件培养时，一些适应性强的种类迅速生长，在生长代谢过程中也产生大量的过氧化物、自由基和超氧化物，结果使生长速率较慢或适应能力较差的微生物受到毒害抑制，或者处于休眠状态[8]，甚至有些微生物发生程序性细胞死亡等[9]。

2.3. 微生物间的相互作用复杂

天然生境微生物种群间关系繁多复杂，诸如拮抗、寄生、协同作用、互养共栖、共代谢等是微生物生态关系中共同协作生存方式，其中后两种是微生物在自然界中重要的生存模式。环境中，共代谢是至少有一个群体为另一个群体提供必需的生长因子从而使微生物群体获利。当它们的距离靠近，本来不能生长的微生物得到另一类提供的生长因子变得可以生长，而当距离较远或不存在时则互不干扰或者干扰程度较低导致这些微生物不可培养[10]，成为所谓的未培养微生物。由于微生物彼此联系，可依靠不同微生物的代谢产物或其他营养物质而生存；但在人工培养基上，无法完全添加这些相互促进生长的未知小分子，从而使彼此依赖的微生物不能分离得到纯菌种[11]。

此外，微生物群落中存在的群体感应(Quorum sensing)也是非常重要的，微生物通过微生物间感应一种信号分子信息交流来判断群体密度大小和生长环境中出现的变化，进而启动相应的基因做出统一协调的应答来调节群体的生长。当微生物的群体密度较低时，自身诱导素合酶基因产生一个基础水平表达，引起自身诱导信号产生，这些信号在微生物细胞外扩散并且立即在周围环境中被稀释。而群体密度不断上升，引起自身诱导素在细胞周围不断积累[12]，激活特定的转录调节蛋白抑制它的活性，致使微生物其他表型的活化[13]。然而，人们进行常规微生物分离过程中，通常会忽视这些群体效应。结果，微生物从天然环境骤然转到人为的培养环境中时，原生境中的生态依存关系遭到破坏，单纯地将待培养的微生物与其他相关的微生物群体分开，菌群间的生物信息交流体系也会发生根本性的改变，物种之间的信息交流被阻断，微生物因缺乏必需的生长因子和信号分子而无法生长，适应性强的物种生长迅速，而生长缓慢的微生物类型则因营养物的匮乏以及种群信息流通的障碍而受到抑制[14]，成为未培养微生物。

2.4. 人工条件无法达到原位培养

自然界微生物的生存环境相当复杂，比如：微生物丰富的多样性、自然环境中的各种化学因素、环境中生物与非生物因素之间的密切相互作用以及微生物水平上的全球生态系统平衡等。由于目前监测技

术和手段的限制，人们对微生物生存环境和自然条件的了解尚不充分。因此，由于人工条件所限，无法完全还原真实场景，没有全部模拟微生物的自然生存条件，为了实现既定的研究目的，通常只是将培养条件进行改善和简化，比如将微生物限定在营养基质简单、通气、温度、pH 等参数恒定而且恒温、恒湿、恒定转速、黑暗的条件下培养；将微生物限制在“板结”的琼脂固体培养基或不搅动的液体介质中；简化或者替换微生物的营养组分或者缺少提供微生物生长繁殖所必需的某种化学因子等。所以在自然界中一些可以生长繁殖的微生物，在实验室“纯培养”的生长条件得不到满足，就此丧失了自由生长的必要条件，从而导致微生物的未培养性[15]。

2.5. 缺乏潜在的外源活性物质

微生物在生境中通常需要一些生命活动所需的活性物质，而实验室的纯培养很难提供微生物潜在重要的外源活性物质。比如，在某些微生物生存的海水或者淡水的环境中，作为生命活动能量的直接来源三磷酸腺苷(ATP)浓度竟可达到 1 nmol/L，很可能源自浮游植物和其他浮游生物。另外，部分藻类分泌出的生长因子和维生素会对许多水生微生物的生长也是必不可少的。而且一些植物、动物病原菌对寄主活性物质的依赖等都是传统实验室纯培养条件下难以提供的[16]。所以，潜在外源活性物质的缺乏也是导致部分微生物难以获得纯培养的重要生态学原因。

2.6. 活的非可培养(VBNC)状态微生物的存在

实验室条件下使用常规培养基培养时，某些微生物进入活的非可培养(Viable but Nonculturable, VBNC)[17]状态，这些微生物依然保持着活性，但不能在常规培养基上生长繁殖的一种特殊生理状态，是微生物对不良环境条件的一种抗逆反应。自从徐怀恕[18]等人首次报道了微生物的 VBNC 状态以后，已陆续有大量微生物在不利的环境下能进入 VBNC 状态的研究报道。环境中的微生物时刻受到各种胁迫因子的影响(如低温、高温、高盐及寡营养等)，这类因子促使微生物自身不断进化并形成多种防御体系，部分细菌可以形成芽孢，如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、肉毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*)等；还有部分微生物则通过进入 VBNC 状态的方式进行自我保护，如单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)[19]等。由于许多微生物经常处于这种状态，而常规的高营养培养基与其原生态环境差别太大，使之难以恢复其原状态。由于种种原因，一部分微生物呈现为未被培养。如果 VBNC 是一种微生物长久存活的状态，那么在环境适宜的条件下是可以将其复苏的。某些情况下直接改变不利条件便可以使 VBNC 微生物复苏，如恢复微生物的培养温度、添加某些营养物质，添加渗透压保护剂，改变光照条件等[20]；也可将非可培养微生物转入到宿主体内孵育，或者将其与宿主共同培养，来使其复苏[21]。以目前的研究水平，是不能将所有的 VBNC 微生物进行复苏的。另外，VBNC 状态也不能一直维持，如果错过了适宜复苏时机或条件时，VBNC 微生物的细胞将会真正的死亡。

2.7. 判断微生物生长状况常规标准存在的缺陷

生存在贫营养环境中的微生物，尽管能够在低浓度营养下生长，但是有些微生物的生长极为缓慢，在常规设定的培养周期内(例如 7 d)没有长成肉眼可见的菌落就被培养者遗弃。除此之外，还有一些寡营养微生物是不会形成菌落的，而是在固体培养基表面上迁徙生长或者扩散生长，它们形成只能显微镜下可见的几个细胞组成的小型集合。这两种情况下，改变微生物生长的判断标准或者检测方法，就可以改变微生物的“未培养性”或者“不可培养性”。

总之，导致微生物不可培养的因素有很多种，有些是因为目前技术手段的限制，有些是因为人类认识水平的不足。只有克服这些制约因素，才可以较好地提高微生物的可培养性。

3. 未培养微生物分离培养技术

3.1. 设计浓度较低的培养基

自 19 世纪, 科赫创立微生物的纯培养分离技术至今, 纯培养分离技术是对微生物进行多种研究的重要手段之一。随着时间的推移, 新型分离培养方法逐渐增多, 越来越多的以前不能培养的、难培养的、寡培养的微生物可以被分离得到。Rolf 等[22]以土壤为样品, 设计出大量不同的培养基进行实验, 结果过量的营养物质但没有必要化合物的富营养培养基会导致菌落数量少。营养丰富的培养基居然不利于微生物的多样化培养, 部分微生物只能在低营养浓度的培养基上分离得到, 营养丰富的培养基却无法分离得到。实验还发现一些优势菌无法在营养度低的培养基上迅速生长, 这样可以减少微生物间的相互抑制, 一些生长缓慢的微生物得以生存下来, 这样可以提高微生物培养的多样性。

实验也可以采用土壤浸出液[23]或者海水[24]等自然环境中的天然培养基直接过滤灭菌进行一定稀释后作为培养基来对微生物进行培养。不过这样的天然培养基营养浓度较低, 势必会造成菌落生长周期长、平板缺水菌落体积小等不利因素制约着后期的微生物分离纯化。所以, 可以将自然培养基和人为培养基综合起来对微生物进行分离培养。对“寡营养菌”的培养比如在合适的培养基上培养时间延长至 3 个月[25], 就可形成肉眼可见的菌落[26], 但是培养时间不能无限延长的, 培养时间越长, 对微生物培养环境的无菌要求就越高[27]。降低接种量的浓度也能够使活菌数增加, 这种菌并不因为接种量的降低而影响它们群落形成[28]。

3.2. 设计稀释样品的培养基

目前海洋微生物获得纯培养的物种不到 1%, 这是由于海洋中的微生物在人工培养时, 培养基中营养物的浓度高于海洋中的。最早, 为了克服这种缺陷, Button 等[29]从概率论的角度出发提出了一个崭新的方法, 即稀释培养法(Dilution culture)。他采用稀释培养结合流式细胞仪[30]计量研究了海洋细菌的多样性, 分离得到两种新的寡营养异氧菌 *Sphingomonas alaskensis* 和 *Cycloclasticus oligotrophus*。最近 Kenters[31]等采用稀释法将羊胃微生物样品稀释至极限剃度(10-10、10-11、10-12)后接种于一种自制的接近原生境的含有羊胃内容物的培养基上培养, 在 1000 个接种试管中有 139 个有微生物生长, 其中 54(58%)个为纯培养物, 大部分微生物的 16SrRNA 相似性为 88%~94%。以 16SrRNA 的相似性低于 93%为一个新属定义, 其中 27(45%)株分别属于 14 个潜在的新属。而相似性大于 97%的大多属于一些未培养的微生物。

3.3. 过滤 - 环境适应法(Filtration-Acclimatization Method, FAM)

针对自然环境中的生物种类繁多且大小不一的特点, 为了获得研究者所需的特定微生物, 生物学家在微生物分离培养之前, 增加了一个步骤, 即经分级过滤去除大的丝状菌, 以及环境样品中有可能经常出现的微生物种群, 最后收集经 0.22 μm 微孔滤膜滤过的环境样品作为目的培养液。然后, 采取逐步增加营养物浓度的方式, 使微生物逐步适应从寡营养过渡到标准营养浓度的生长培养基中。经此过滤适应培养法, 田甜等[32]从环境样品中获得 65 株细菌的纯培养, 而采用常规的标准培养流程, 同样的海水样品则未能分离出一株类似的细菌。该方法增加了可培养微生物的多样性, 今后, 可采取适当调整过滤孔径, 将环境适应程序与其他方法例如稀释法结合的技术路线, 有可能获得更多的环境微生物新物种。

3.4. 高通量培养方法

为了从环境中筛选出新的生物化学分子和酶类, 发展不依赖培养基并提高微生物的分离率的方法, Connon 等[33]在稀释培养法的基础上提出高通量培养技术(high-throughput culturing, HTC), 该技术主要是利用低营养的培养基, 通过将微生物群体稀释至痕量约 103 个/mL 后, 采用小体积的 48 孔细胞培养板进

行高通量的培养结合流式细胞仪检测进行实验,从而寡营养微生物可以不受其他优势微生物的干扰,能够分离培养出来。高通量培养方法还可以结合微量细胞培养板和荧光原位杂交技术(FISH)分离培养并检测出许多微生物这样既提高微生物的可培养性,又在短时间内监测大量的培养物,提高培养的工作效率。

Nichols 等[34]设计了一种高通量微生物分离芯片(Ichip),这种分离芯片包含数百个微型扩散孔,每个扩散孔只含有单个微生物细胞。通过这种芯片分离得到约 40%海水微生物种类和 50%土壤微生物种类,其中海水样品中具有 62 个(28.3%)、土壤样具有 86 个(28.7%)纯培养微生物的 rRNA 相似性小于 95%。由此可以证明此方法能较好的模拟自然环境下的微生物区系组成,不过还是要依赖特殊的附着培养载体,同时由于自然环境纷繁复杂,人工不可能模拟出一模一样,故与真实自然环境下的微生物区系还是有所差别。

3.5. 设计添加促进因子的培养基

微生物的多样性表现在生理代谢的多样性及复杂性,不同的微生物生长代谢类型不同,对反应的底物要求也存在差异。营养要求不同的微生物在同样的环境生长,有些微生物的代谢产物或者次生代谢产物会造成促进或抑制另一种微生物。因此,根据微生物的某些特性,在传统的培养方法基础上,通过添加一些可以降低有害物质的影响因子和促进生长的有益因子,以及微生物生长发育所需的营养成分,则可简单模拟微生物之间的相互作用,满足微生物生长繁殖的要求来提高微生物的可培养率,从而使以前无法培养的变成可培养的。

Bruns 等[35]设计出 ABWP 和 ABWM 两种培养基,此培养基中添加环磷酸腺苷(cAMP),N-丁酰高丝氨酸内酯等参与多种基因调控的信号分子,实验结果离得到一种细菌,此细菌只能在 cAMP 存在状态下才可以生长。说明设计添加促进因子的培养基可以分离得到之前没有分离出来的微生物。与革兰氏阴性菌多种基因调控有关的 cAMP 经证明是最有效的信号分子。生物学家在一种光合细菌,即沼泽红假单胞菌中发现具有密度感应功能的信号分子 p-coumaroyl-高丝氨酸内酯[36],氮酰高丝氨酸内酯也可以有效地提高微生物可培性。这对于改善微生物的培养状况都是有益的。

3.6. 设计非常规的电子供体与电子受体的培养基

微生物代谢过程的不同,对反应底物的需求就不同。供应微生物所需的特有底物,可有助于新陈代谢反应的进行及微生物的正常生长。将新颖的电子供体和受体应用到微生物培养中,能够发现未知的生理型微生物。Upfoff[37]等对欧洲北海中的微生物多样性研究发现,添加多种不同碳源和复杂化合物的培养基上生长的微生物种类和数量都要多于单一碳源培养基,在单一碳源培养基分离到的菌种几乎都是变形菌门的细菌,而多碳源的复合培养基则分离到 4 种其他门类的微生物。Coates 等[38]利用 2,6-蒽氢醌二磺酸(AHDS)作为电子供体,硝酸盐为电子受体于培养基中,分离获得 6 株能在厌氧下氧化 AHDS 的新型细菌。Santini 等[39]从澳大利亚金矿中分出以亚砷酸为电子供体,氧为受体,以 CO₂ 为唯一碳源的化能自养菌 NT-26。通过细菌 16SrDNA 基因序列分析对比结果表明,NT-26 有可能属于 α -Proteobacteria(变形菌纲)土壤杆菌的一个根瘤菌分支,很可能是一个新菌种。

应该指出,采用这种方式改善难培养微生物的前提是要对目的微生物生理特性具备一定的了解。现今报道了不同电子供体和受体的成功应用,发现了很多前所未有的生理型微生物,采用非传统的生长底物是可以促进新型微生物的生长的,所以总结如表 1 所示,可供参考。

3.7. 微生物实现群体培养

自然环境中的微生物很多都不是独立生存的,它们之间通过交换代谢产物或者特异信号分子来进行

Table 1. Growth-supporting reactions relating to the recent cultivation of novel organisms

表 1. 新型生化反应支持的新型微生物的培养

| Growth-supporting reactions | References |
|--|------------|
| 1. $2\text{H}_3\text{AsO}_3(\text{亚砷酸}) + \text{O}_2 \rightarrow \text{HASO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{AsO}_4^- + 3\text{H}^+$ | [39] |
| 2. $\text{H}_2\text{AsO}_3^- + \text{NO}_3^- \rightarrow \text{H}_2\text{AsO}_4^- + \text{NO}_2^-$ | [40] |
| 3. $4\text{HPO}_3^{2-}(\text{亚磷酸}) + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow 4\text{HPO}_4^{2-} + \text{HS}^-$ | [41] |
| 4. $4\text{HPO}_3^{2-} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{HPO}_4^{2-} + \text{CH}_3\text{CO}_2^- (\text{乙酸}) + \text{H}^+$ | [42] |
| 5. $5\text{AHDS}_2^- + 2\text{NO}_3^- + 7\text{H}^+ \rightarrow 5\text{ADS}_2^- + \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ | [38] |
| 6. $\text{C}_6\text{H}_6(\text{苯}) + 6\text{NO}_3^- + 6\text{H}^+ \rightarrow 6\text{CO}_2 + 3\text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ | [43] |
| 7. $42\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}(\text{2-氯苯酚}) + \text{CH}_3\text{COOH}(\text{乙酸}) + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{C}_6\text{H}_5\text{OH} + 4\text{Cl}^- + 4\text{H}^+ + 2\text{CO}_2$ | [44] |
| 8. $\text{HClO}_4(\text{过氯酸}) + \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}(\text{乙酸}) \rightarrow \text{Cl}^- + \text{H}^+ + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ | [45] |
| 9. $4\text{Fe}(\text{II}) + \text{O}_2 + 4\text{H}^+ \rightarrow 4\text{Fe}(\text{III}) + 2\text{H}_2\text{O}$ | [46] |

微生物细胞间交流的,有些微生物间会竞争有限的生存环境[47],有些微生物会共同利用微量元素和螯合剂等,所以单一的纯培养微生物是不能完成复杂的细胞之间的相互交流。多细胞培养装置和生物膜,都证明了单个物种无法实现的多功能培养。微生物群体培养才可以有效地得到共生和互生类型的微生物。Plugge 等[48]已经利用透析膜反应器的群体培养方法,成功的从厌氧淤泥中培养出厌氧嗜热的降解谷氨酸的微生物。

3.7.1. 微生物包埋法

微生物细胞包埋法也称为凝胶微滴培养法、单细胞封装培养法。是近年来 Zengler 等[49]提出的新型微生物分离技术。这种方法主要利用凝胶微滴技术对环境中的单个微生物细胞进行包埋,结合使用流式细胞仪的一种高通量分离培养技术。

Zengler 将海水样品稀释到一定浓度与融化的琼脂糖混合,用搅拌器油乳化,形成直径 30 μm ~50 μm 的微滴,其中 10% 的胶滴会含有单个细胞。这样制成包埋单个微生物细胞的琼脂糖微囊即微滴胶囊(microdroplets, GMDS),然后将其装入端用 0.1 μm 滤膜封口灭菌的凝胶层析柱中,出口端用 8 μm 滤膜封住。再灌注低浓度的有机物培养液、自然培养液或者培养基为灭菌海水、补充少量 K_2HPO_4 、 NH_4Cl 、微量金属与维生素,连续通过层析柱对包埋胶囊进行流态培养,未被包埋的游离微生物细胞则会随培养液流出柱外。

2010 年,山东大学高秀珍等[50]将此技术应用于土壤粘细菌多样性的开发,用土壤抽出液用 0.185% 的 NaCl 液适当稀释,并在凝滴培养液中加入不同种属的粘细菌助长菌株。经 1 周培养,多数微孔菌浓度可达 107 PmL,并从中获得有抑制真菌活力的培养。根据 16SrRNA 的对比确定,实验最终分离纯化得到有新的粘细菌菌株。

该技术具有以下优点: a) 尽管微生物细胞被孤立,所有的细胞都在一起培养,微囊孔径较大,代谢产物等均可自由交换,通过物质交换增加微生物的可培养性。b) 微囊是一个开放的、连续补充营养的系统,这模拟了自然环境的开放条件。c) 不仅能高通量的分离和培养微生物,而且微生物通过微囊封装包埋后,单个细胞在微囊中不断分裂,可保证微生物生长单一性,方便微生物的纯化。d) 长出的微菌落可用于接种扩大培养,可获得大量的微生物的纯培养。e) 经典的海洋微生物的分离培养方法是将海洋环境中的微生物混合培养后再分离单菌落,最终只能得到少数几种微生物的纯培养。该方法是将海洋环境中的单一微生物分离后再进行培养,最终使大量的微生物获得纯培养,增加细胞检测的灵敏度,缩短低生

长率细胞的培养时间，提高了微生物的可培养性。

3.7.2. 扩散生长盒培养法

扩散生长盒培养法，是 Kaeberlein 等[51]在分离培养海岸潮间带底部泥中的微生物时，通过模拟海洋微生物自然生长的环境，设计出名为扩散生长盒(diffusion growth chamber)的自制培养仪器，使用这种仪器培养分离微生物生物方法。该扩散盒由一个环状的不锈钢垫圈和两侧胶连的孔径为 0.03 μm 的滤膜组成，滤膜既允许有益的小分子代谢物质和圈内外微生物产生的活性物质透过膜进出小室自由出入，化学物质在盒内和环境之间进行交流又不能让微生物细胞通过造成逃逸。扩散盒内加入被分离的环境样品即海洋微生物样品与琼脂的混合物，封闭后置于在模拟采样点环境条件的玻璃缸中进行培养，并不断注入新鲜的海水循环流动。1 周后，培养基上产生大量的形态各异的微型菌落，数目高达接种微生物的 40%，微菌落中多数为混合培养，须再次分离，以获得纯种。并且从海水中分离到一株新的菌株，此菌株不能在人工合成的固体培养基上单独生长，而要在其他海洋微生物共存的条件才能形成菌落。

从生态角度上看，微生物生长是相互依存的，共培养生长的微生物之间能传递一些特殊的讯号，如信息素之类[52]，从而使得就算脱离了自然环境，微生物之间也能彼此依靠而形成菌落。2010 年，Bollmann 等[53]利用扩散盒培养法从污染水体的沉积物中分离得到包括 α 、 β 、 γ 变形菌纲，放线菌门，厚壁菌门等许多纯培养菌株，菌群结构呈现出丰富的多样性特征。这种培养方法能较大程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，可保证微生物群落之间作用的存在，提高了微生物的可培养性。

3.8. 降低培养过程中的毒害作用

减少培养基中的毒性氧化物质的产生是提高培养微生物的有利方法。可以增加多聚物作为碳源，因为只有当多聚物被水解成小分子物质时才有可能被利用，这样微生物在短时间培养内不会受到毒害作用，而且有效地减缓了微生物受毒害的速度，可以提高微生物培养的多样性[54]。于此同时，充足的氧气有时也是毒性氧产生的原因，减少培养环境中的氧分压就可以减弱毒性氧的影响[55]。但有些情况下，毒性氧是来源于微生物生命活动以外的过程，例如高压灭菌等。为了减少各种过程产生的毒性氧，可以向培养过程中添加具有毒性氧降解能力的物质，例如丙酮酸钠等过氧化氢降解物和抗氧化剂二硫代二丙酸等[56]。

3.9. 培养放线菌的新方法

放线菌门是细菌域中的主要类群，众所周知，革兰氏阳性的放线菌是获取抗生素的重要来源，但以上介绍的微生物培养的各种新技术都没有专门针对分离纯化放线菌类。为了更有效地从环境中获取更多种类的放线菌资源，Gavrish 等[57]根据放线菌独特的长菌丝以及能穿透固体培养基的特性提出了一种专门筛选放线菌的新方法。将装有灭菌琼脂的塑料容器上下两边分别用两片具有半透性的薄膜密封，上层膜的孔径为 0.03 μm ，下层膜的孔径为 0.2~0.6 μm ，环境中细丝状的原核微生物就会选择性的刺入装置，并生长行成菌落，而丝状真菌则因膜孔径太小而被排除在培养装置的外面。将此装置放置在土壤中，室温黑暗条件下培养 14~21 天后，将装置中间的琼脂层从无菌的环境中取出，经过镜检观察，就可将生长的放线菌菌落挑出，纯化。与常规的传统平皿培养方法相比较，这种方法不仅获得大量丝状放线菌类，种群多样性也更加丰富，最重要的是，这种培养方法使一些非常罕见的放线菌类得到了纯培养。此方法也可适用于海洋放线菌的分离纯化。

4. 发展前景

尽管我们已经取得了上述微生物多样性的进展，生物学家也清醒的意识到，由于微生物生存环境的

复杂性, 未培养微生物数量巨大, 种类繁多的现实性, 在探索微生物多样性的过程中仍旧面临着许多的挑战。对于现今的研究状况, Alain K[58]提出: 在模拟自然环境条件时, 维持微生物之间的相互关系, 集微生物的遗传和生理生化特性信息为一体的前提下, 设计出添加有仿原生境的微量元素、生长因子、微生物分泌信号分子或促进复苏因子的新型培养基, 以及对于微生物相互作用的群体培养高通量装置, 有效的培养出共生或协作的微生物, 是今后提高微生物可培养性的发展趋势。其实在尝试各种培养方法的同时, 辅助以相应的灵敏度高的观察、检测技术是很重要的。一般, 目的环境中微生物可培养率被低估的原因之一就是受传统检测方法的限制, 所以, 可以将荧光显微技术、流式细胞技术、细菌染色技术、可分辨环境样品中存活或者损伤或者死亡细胞的双链核酸染色技术等应用于环境微生物的检测中, 能够有效的提高可培养微生物的比例[10]。这些技术的研发与应用都为微生物多样性的研究开拓出一片崭新的天地, 许多曾经被认为是不可培养或未培养的微生物已经成为可培养微生物中的成员, 也极大地丰富了可培养微生物种群多样性的资源宝库, 并为开发这些微生物资源的开发与利用奠定了良好的研究基础。

可培养本身不是微生物细胞的特性, 在一定程度上微生物是否可培养取决于能否找到适宜的方法。现今存在着有许多因素阻碍环境微生物在人工培养基上的复苏生长, 共同协作的自然生存方式的崩溃、环境的极度营养变化、细胞间活性物质和通讯的中断及生态位变化等都是未培养微生物存在的重要原因。到目前为止, 即便在国外, 许多科学实验室研究似乎都是停留在对于已分离到的微生物进行鉴定和分类的层面上, 并没有对未培养微生物的可培养机理进行深入的研究。所以, 对于已分离到的未培养微生物, 深入研究其培养成活的因素是一个有困难但却非常有意义的课题。是由于培养基的成分、培养温度、时间、氧气需要, pH 大小等常见问题, 还是受到原环境中其他微生物分泌的某种糖类、肽类等小分子影响因子的控制的细节问题, 都是需要值得进行深入探索的。只有当建立了某种难培养微生物的可培养机理, 科研人员才能更有目的性的对于同种类型的未培养、难培养微生物进行大量的开发利用, 这样才能建立更完善的微生物多样性的进化库, 才能发现越来越多的未培养微生物, 这样会让少数微生物在高淘汰、高筛选要求的新材料、新药物等的菌种研发中脱颖而出。

总之, 由于地球上的微生物群落及其生存环境的复杂性, 以及新陈代谢途径、生理生化反应还是产物等, 都存在着丰富的新颖性和多样性, 因而在进行扩大培养新技术的研发和实际应用时, 不能仅限于其中的一种或一类方法, 而应综合考虑, 采用多种行之有效的技术相结合的方法。与此同时, 新型微生物培养技术的开发还应结合相关的分子生物学技术, 分子生物学技术研究自然环境中微生物多样性, 可以在很大程度上能够克服传统纯培养技术的不足, 是一条探索未培养微生物的新途径, 还应该结合其他学科的理论 and 实验技术, 这样取长补短, 相辅相成, 才能更好的拓展微生物的可培养性, 通过各方面人员的努力, 争取培养出更多的“未培养微生物”。增强微生物的可培养性、把更多的未培养微生物转变成可培养微生物将是一件意义非常重大的工作。

基金项目

国家自然科学基金面上项目(31270535); 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD201206); 黑龙江省杰出青年科学基金(JC201306)。

参考文献 (References)

- [1] Boone, D.R., Castenholz, R.W. and Garrity, G.M. (2001) *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol. 1). Springer, New York.
- [2] Newman, D.K. and Banfield, J.F. (2002) Geomicrobiology: How molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. *Science*, **296**, 1071-1077.
- [3] 朱允华, 李俭, 方俊, 田云, 卢向阳 (2011) 宏基因组技术在开发极端环境未培养微生物中的应用. *生物技术通*

- 报, **9**, 52-58.
- [4] Griffith, K.J., Noriega, N.F., Johnson, C.N. and Grimes, D.J. (2011) Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in the viable but nonculturable state using direct plate counts and recognition of individual gene fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, **85**, 114-118.
- [5] 高鹤, 赵勇, 刘承初 (2014) 致病微生物应对环境胁迫形成的 VBNC 状态及其对风险评估的潜在影响. *微生物学通报*, **1**, 169-177.
- [6] Cho, J.-C. and Giovannoni, S.J. (2004) Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine gammaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 432-440.
- [7] Zhang, X.M. and Zhang, X.H. (2009) New culture approaches of marine microorganisms. *Marine Sciences*, **33**, 99-104. (in Chinese)
- [8] 张秀明, 张晓华 (2009) 海洋微生物培养新技术的研究进展. *海洋科学*, **6**, 99-104.
- [9] 蒋娜, 李健强, 罗来鑫 (2013) 植物病原细菌的 VBNC 状态研究进展. *植物病理学报*, **3**, 249-257.
- [10] 潘虎, 卢向阳, 董俊德 (2012) 未培养微生物研究策略概述. *生物学杂志*, **1**, 79-83.
- [11] 姜海琴, 范彩云, 李吕木, 程建波 (2011) 宏基因组技术在筛选未培养微生物中新型酶的研究进展. *湖北农业科学*, **50**, 3673-3676.
- [12] Kolodkin-Gal, I. and Engelberg-Kulka, H. (2008) The extracellular death factor: Physiological and genetic factors influencing its production and response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **190**, 3169-3175.
- [13] Pereira, C., Mc Auley, J.R., Taga, M.E., Xavier, K.B. and Miller, S.T. (2009) *Sinorhizobium meliloti*, a bacterium lacking the autoinducer-2(AI-2) synthase responds to AI-2 supplied by other bacteria. *Molecular Microbiology*, **70**, 1223-1235.
- [14] 周玥, 刘小锦, 朱晨光 (2004) 细菌中群体感应调节系统. *微生物学报*, **1**, 122-126.
- [15] 彭伶俐, 王琴, 辛明秀 (2011) 自然界中不可培养微生物的研究进展. *微生物学杂志*, **2**, 75-79.
- [16] Sanmee, R., Lumyong, P., Dell, B. and Lumyong, S. (2010) *In vitro* cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand. *Mycoscience*, **51**, 15-22.
- [17] Santander, R.D., Catala-Senent, J.F., Marco-Noales, E. and Biosca, E.G. (2012) In planta recovery of *Erwinia amylovora* viable but nonculturable cell. *Trees*, **26**, 75-82.
- [18] 徐怀恕, 黄备, 祁自忠 (1997) 霍乱弧菌(*V. cholerae*)的细胞形态研究—活的非可培养状态细胞. *青岛海洋大学学报*, **2**, 187-190.
- [19] Besnard, V., Federighi, M. and Cappelletti, J.M. (2011) Evidence of viable but non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. *Food Microbiology*, **17**, 697-704.
- [20] 鄂佳, 梁景平 (2011) 活的非可培养状态下的粪肠球菌的研究进展. *国际口腔医学杂志*, **4**, 430-432.
- [21] 李伦, 李元, 白婧, 许崇波 (2010) 细菌复苏促进因子. *动物医学进展*, **4**, 103-106.
- [22] Olsen, R.A. and Bakken, L.R. (1987) Viability of soil bacteria: Optimization of plate-counting technic and comparison between total counts and plate within different size groups. *Microbial Ecology*, **13**, 59-74.
- [23] Ferrari, B.C., Binnerup, S.J. and Gillings, M. (2005) Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 8714-8720.
- [24] Bollmann, A., Lewis, K. and Epstein, S.S. (2007) Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 6386-6390.
- [25] 史立君, 徐丽娟, 刘润进 (2011) 与植物共生的难培养菌物及其培养特性研究进展. *微生物学通报*, **1**, 110-117.
- [26] Stott, M.B., Crowe, M.A., Mountain, B.W., Smirnova, A.V., Hou, S., Alam, M. and Dunfield, P.F. (2008) Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. *Environmental Microbiology*, **10**, 2030-2041.
- [27] 袁静, 李清明 (2012) 未培养微生物筛选高纤维素酶活性基因的研究进展. *农产品加工*, **3**, 11-13.
- [28] Davis, K.E.R., Joseph, S.J. and Janssen, P.H. (2005) Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 826-834.
- [29] Button, D.K., Schut, F., Quang, P., Martin, R. and Robertson, B.R. (1993) Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: Theory, procedures, and initial results. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 881-891.
- [30] 刘新星, 霍转转, 云慧, 杨英杰 (2014) 流式细胞术在细菌快速检测中的应用. *微生物学通报*, **1**, 161-168.
- [31] Kenters, N., Henderson, G., Jeyanathan, J., Kittelmann, S. and Janssen, P.H. (2010) Isolation of previously uncultured

- rumen bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium. *Journal of Microbiological Methods*, **84**, 52-60.
- [32] 田甜, 李冬梅, 戴世鲲 (2009) 海洋环境中难培养微生物的寡营养培养. *微生物学通报*, **7**, 1031-1039.
- [33] Cannon, S.A. and Giovannoni, S.J. (2002) High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3878-3885.
- [34] Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E.M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K. and Epstein, S.S. (2010) Use of ichip for highthrough put *in Situ* cultivation of “uncultivable” microbial species. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 2445-2450.
- [35] Bruns, A., Cypionka, H. and Overmann, J. (2002) Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic sea. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3978-3987.
- [36] Hirakawa, H. (2013) Tomita H: A new class of Acyl-homoserine lactone quorum sensing signals. *Nihon Saikingaku Zasshi*, **68**, 325-335.
- [37] Upfoff, H.U., Felske, A., Fehr, W. and Wagner-Döbler, I. (2001) The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: A molecular screening of marine isolates. *FEMS Microbiology Ecology*, **35**, 249-258.
- [38] Coates, J.D., Cole, K.A., Chakraborty, R., O'Connor, S.M. and Achenbach, L.A. (2002) Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2445-2452.
- [39] Santini, J.M., Sly, L.I., Schnagl, R.D. and Macy, J.M. (2000) A new chemolitho-autotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: Phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 92-97.
- [40] Oremland, R.S., Hoelt, S.E., Santini, J.M., Bano, N., Hollibaugh, R.A. and Hollibaugh, J.T. (2002) Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MIHE-1. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 4795-4802.
- [41] Schink, B. and Friedrich, M. (2000) Phosphite oxidation by sulfate reduction. *Nature*, **6**, 37-43.
- [42] Schink, B., Thiemann, V., Laue, H. and Friedrich, M.W. (2002) Desulfotigenum phosphitoxidans sp.nov., a new marine sulfate reducer that oxidizes phosphite to phosphate. *Archives of Microbiology*, **177**, 381-391.
- [43] Coates, J.D., Chakraborty, R., Lack, J.D., O'Connor, S.M., Cole, K.A., Bender, K.S. and Achenbach, L.A. (2001) Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of Dechloromonas. *Nature*, **411**, 1039-1043.
- [44] Sanford, R.A., Cole, J.R. and Tiedje, J.M. (2002) Characterization and description of Anaeromyxobacter dehalogenans gen. nov., sp. nov., an aryl-halo-respiring facultative anaerobic Myxobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 893-900.
- [45] Achenbach, L.A., Michaelidou, U., Bruce, R.A., Fryman, J. and Coates, J.D. (2001) Dechloromonas agitala gen. nov., sp. nov. and Dechlorosoma suillum gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per) chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**, 527-533.
- [46] Emerson, D. and Moyer, C.L. (2002) Neutrophilic Fe-oxidizing bacteria are abundant at the Loihi Seamount hydrothermal vents and play a major role in Fe oxide deposition. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3085-3093.
- [47] D'Onofrio, A., Crawford, J.M., Witt, K., Gavrish, E., Epstein, S., Clardy, J. and Lewis, K. (2010) Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chemistry & Biology*, **17**, 254-264.
- [48] Plugge, C.M. and Stams, A.J. (2002) Enrichment of thermophilic syntrophic anaerobic glutamate-degrading consortia using a dialysis membrane reactor. *Microbial Ecology*, **43**, 379-387.
- [49] Zengler, K., Walcher, M., Clark, G., Haller, I., Toledo, G., Holland, T., Mathur, E.J., Woodnutt, G., Short, J.M. and Keller, M. (2005) High-throughput cultivation of microorganisms using microcapsules. *Methods in Enzymology*, **397**, 124-130.
- [50] 高秀珍 (2010) 微包埋培养技术的建立及其在粘细菌分离纯化中的应用. 硕士学位论文, 山东大学, 济南.
- [51] Kaeberlein, T., Lewis, K. and Epstein, S.S. (2002) Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, **296**, 1127-1129.
- [52] 丁林贤, 张萍华, 洪华端, 林红军, 横田明 (2012) 藤黄微球菌 Rpf 活性蛋白的制取及其对红球菌 VBNC 菌体的复苏作用. *微生物学报*, **1**, 77-82.
- [53] Bollmann, A., Palumbo, A.V., Lewis, K. and Epstein, S.S. (2010) Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 7413-7419.

- [54] 曾建民, 曾振顺, 原红娟 (2012) 难培养微生物培养方法的研究进展. *生物技术进展*, **3**, 165-170.
- [55] Stevenson, B.S., Eichorst, S.A., Wertz, J.T., Schmidt, T.M. and Breznak, J.A. (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 4748-4755.
- [56] Nichols, D., Lewis, K., Orjala, J., Mo, S., Ortenberg, R., O'Connor, P., Zhao, C., Vouros, P., Kaeberlein, T. and Epstein, S.S. (2008) Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow *in Vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 4889-4897.
- [57] Gavrish, E., Bollmann, A., Epstein, S. and Lewis, K. (2008) A trap for *in Situ* cultivation of filamentous Actinobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, **72**, 257-262.
- [58] Alain, K. and Querellon, J. (2009) Cultivating the uncultured: Limits, advances and future challenges. *Extremophiles*, **13**, 583-594.