

土壤微生物分离新技术的研究进展*

袁志辉^{1,2} 王健¹ 杨文蛟¹ 吴永尧^{1†}

(1 湖南农业大学生物科学技术学院,长沙 410000)

(2 湖南科技学院生命科学与化学工程系,湖南永州 425199)

摘要 土壤是环境微生物学研究中最具挑战性的环境,也是生物分子、遗传资源开发的热点区域。在“宏-组学”方法快速发展的今天,土壤微生物分离培养技术在微生物环境功能研究、代谢途径的阐明、特定功能的验证及基础实验和生产实践的应用等方面仍然发挥着重要作用。本文首先分析了大多数环境微生物不能被分离培养的几个原因。然后重点综述了近年来在土壤微生物分离培养技术方面的探索,主要包括生长培养基的优化和重新设计如培养基稀释分离、添加生长限制因子、更换凝固剂等,在延长培养时间、改善含氧量、降低培养温度等方面对生长条件进行改进,采用“扩散盒”、“原位培养陷阱”等技术对微生物进行天然环境原位培养,对环境微生物群体培养和共培养,利用“宏基因组学”“宏蛋白质组学”等非培养技术辅助分离等。最后,作者对未来土壤微生物分离研究的方向提出了自己的建议。

关键词 土壤微生物;未培养微生物;分离新技术

中图分类号 Q938. 1³ **文献标识码** A

在环境微生物学的研究中,土壤是最具挑战性的环境。首先,在土壤中共生存着数量巨大和多样性丰富的微生物群。仅就原核生物而言,1 g 土壤中约有 2 000 至 18 000 种^[1],可能超过已知总的种类数(截止 2013 年 9 月 19 日在 NCBI 上的细菌和古细菌总的统计数为 17 056)。其次,土壤系统不仅组成复杂^[2],而且地理位置和垂直深度不同,其空气、水分的含量也不同,固体物质的理化性质、颗粒形状大小、内部结构、有机物质含量等也可能存在较大的差异,所有这些均会导致微生物的数量和种类发生巨大的变化^[3-4]。

目前对土壤微生物的研究主要采用培养法和非培养法两类方式进行。在发现土壤中超过 99% 的微生物不能被传统的培养技术所分离^[5]之后,非培养法如宏基因组学^[6]、宏蛋白质组学(Metaproteomics)^[7]、宏转录组学(Metatranscriptomics)^[8]以及联合使用多种“宏-组学”(Meta-omics)的方法^[9-10]等“未培养微生物(Non-Culturable)”研究技术日益发展。尽管如此,对于微生物的分离培养技术而言,从微生物学诞生至今,其在微生物学研究

发展过程中一直起着重要作用。对于未来的微生物学研究,分离培养技术也同样不可或缺。本文将从微生物分离培养的必要性、不能分离培养的原因、土壤微生物分离培养新技术等方面对土壤微生物分离培养动态及新技术进行综述,并对土壤微生物分离研究方向提出了建议。

1 微生物分离培养的必要性

现代分子生物学技术在环境微生物研究中的应用为我们揭示了前所未有的微生物多样性,但在已获得的组学信息和基因或蛋白质的确切功能之间还有不小的差距^[11]。宏基因组学技术使我们发现了微生物物种、遗传、代谢等方面丰富的多样性,但宏基因组学自身也存在一些难以弥补的缺陷^[12-13]。宏蛋白质组学和宏转录组学的发展在一定程度上弥补了宏基因组学的不足,但也产生了新的问题,如宏蛋白质组学研究中,环境样品中蛋白质的分离目前还没有通用的有效方法^[14],以及如何判断哪些蛋白质是微生物只会在特定环境下表

* 湖南省研究生科研创新项目(CX2014B298)资助

† 通讯作者,E-mail:yywgzyx@126.com

作者简介:袁志辉(1981—),男,江西宜春人,博士研究生,讲师,主要从事天然产物开发与利用研究。E-mail:zhz_yuan@126.com

收稿日期:2013-11-27;收到修改稿日期:2014-02-18

达等。而宏转录组学分析方法难以对多个样品的微生物群落结构同时进行分析,结果的准确性也得不到保证^[15]。因此,单纯运用组学或“宏-组学”方法对复杂环境如土壤的特异微生物群体进行生理学和代谢分析还存在很大的难度。

而纯培养技术的进步将使我们能够获得一些新的纯种微生物,这些纯培养物可以用来验证和修正通过宏-组学方法推测得到的信息^[16],许多生理生化特征的鉴定、代谢途径的阐明、遗传信息的揭示及其在医学医药、生物技术上的应用也均是建立在对纯培养物的研究上。微生物纯培养物的获得不仅能够提供生理学、遗传学、病理学等研究的对象,扩大了进行基础研究的范围,也可获得一些能够应用于工业生产的新菌株。可以说分离培养技术的进步是分子生物学、微生物生理学及生物技术进步和发展的前提条件。但大多数微生物不能被传统方法所培养已成为目前微生物学界的共识。

2 获得纯培养的限制因素

传统的分离培养方法在生物因素和非生物因素两方面均很难符合大多数微生物的生长需求,即微生物在人工生长条件下难以适应从自然到人工条件的转变而停止生长甚至死亡。一直以来,微生物学家们对大多数微生物不能被培养的原因进行了长期的研究和探索,归纳出了导致大多数微生物不能被分离的可能原因,如人工营养基质浓度过高、原有生态关系被破坏、生长缓慢的微生物被忽视等^[17-19]。

从根本上说,大多数微生物在实验室里不能被培养的原因是我们不清楚这些微生物的具体生长需求,所以只能根据现有的资料和数据对其生长环境进行模拟。但有些环境条件是很难被完全模拟出来的:

(1)微生物栖息地的化学条件。土壤,尤其是富含有机质的土壤,其组成十分复杂^[1],即使事前进行了成分分析,也难以在培养基的设计和配制过程中做到准确。而某些关键化学成分对于微生物的生长和分离而言可能是至关重要的。

(2)与一些生物因素和非生物因素的互作关系。在大多数的环境下,微生物都不是孤立的,其与周围环境的生物或其他因素存在广泛的联系如共栖、互生、共生等,这些生态关系在实验室条件下很难真正模拟。此外,土壤微生物相互之间的共同

协作、代谢产物交流、信号分子交换、或为有限的生存资源进行的竞争^[20-21],以及复杂的细胞间交流,几乎不可能在纯培养的条件下模拟。

(3)在微生物水平上的生态系统功能和气候变化效应。在自然环境中,微生物可以通过群体感应调节自身的基因表达等行为以适应周围环境的变化^[22]。虽然目前已经知道环腺苷酸(Cyclic Adenosine Monophosphate, cAMP)、酰基高丝氨酸环内酯(N-Acyl Homoserine Lactones, AHLs)等为群体感应行为的信号分子,并能用于提高微生物分离效率^[23],但在多数情况下,我们并不清楚微生物生长过程中有哪些信号分子参与。此外,大气CO₂浓度、气温、降雨量等单独或联合作用均会使土壤细菌和真菌的丰度发生变化,而降雨的影响尤为显著^[24]。由此可以推测,气候变化对某些微生物的生存及其功能发挥而言会有较大影响,而实验室模拟这种变化比较困难。

(4)天然栖息环境的结构。土壤系统是由各种理化梯度不同、环境条件不连续的微环境所组成,其中包含着大大小小的微孔颗粒结构^[25]。而多数土壤微生物群体的聚集具有颗粒特异性,如突柄杆菌属(*Prostheco bacter*)和酸杆菌属(*Acidobacterium/Holophaga*)更倾向生存于小颗粒(即泥沙和灰分)中, α -变形杆菌则更多地存在于大颗粒(细沙)中,并且土壤小颗粒中的微生物多样性较大颗粒更丰富^[3]。如何在微生物的实验室分离培养过程中模拟这些土壤颗粒的特异结构则是又一个需要考虑的问题。

在发现以上这些问题之后,研究人员已经找到了部分问题的解决办法,并由此产生了一些微生物分离培养新技术。如为更准确模拟微生物栖息地的化学条件,可以进行生长培养基的重新设计和优化,甚至可以通过选择透性滤膜直接进行天然环境原位培养;天然环境原位培养技术还可以减少非生物因素对土壤微生物生长的影响,而群体培养和共培养技术则从生物因素方面解决了微生物群体之间互作关系的问题。下面就分离培养技术的新进展进行重点讨论。

3 微生物分离培养新技术的探索

“未培养微生物”并不意味着不能被培养,只是其某些生长需求尚不清楚。通过生长培养基的重新设计和优化、生长条件的改进、天然环境原位培

养、群体培养和共培养、非培养法辅助分离等手段,许多原本未被培养的微生物可以在实验室中获得纯培养。

3.1 生长培养基的优化和重新设计

现有的微生物培养基种类繁多,总数庞大,但在分离“未培养微生物”的研究中犹显不足。针对不同的微生物对能量、营养和理化条件的需求也不同(包括各因子的种类和浓度不同),现有培养基经过适当的优化改造可以用于新的微生物的分离培养。如对传统培养基进行稀释,已经成功地分离出一些新的微生物。Janssen 等^[26]采用 1/100 浓度的营养肉汤培养基、延长培养时间以及与超声波处理样品相结合的方式,从土壤样品中分离出了多个门类的新的微生物。Stevenson 等^[27]采用优化培养条件包括稀释培养基的方法,也从农田土壤和食木白蚁的肠道中分离到放线菌门(*Actinobacteria*)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*)的新成员。在对于其他土壤的微生物分离研究中,这项策略也被广泛运用^[28-30]。培养基稀释法能够取得成功的原因可能在于低浓度的营养使微生物在生长初期不会产生大量的、自身难以调节的过氧化物、超氧化物和羟基自由基等毒性氧物质,而这些物质快速、过量的积累恰恰是许多微生物不可培养的重要原因^[18]。

通过对环境样品的特性、微生物生态关系和其他生长相关因素的综合考虑,研究人员重新设计的生长培养基和新开发的培养策略也成功地运用到新种微生物的分离培养当中。

Hamaki 等^[31]通过土壤加碱浸提的方式制备了一种土壤浸提液琼脂培养基(*Soil-Extract Agar Medium*),结合微菌落显微检测的方法用于土壤微生物的分离,获得了 2 个细菌新属和 4 个放线菌新种。最近,一种名为双重限制选择性培养基设计程序(*Selective Medium Design Algorithm Restricted by Two Constraints, SMART*)的方法被用于高度选择性培养基的设计^[32],取得了良好的效果。SMART 方法的原理为:先从 KEGG 数据库(*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG*)中检索目标菌或亲缘关系与目标菌相近的微生物的碳源谱,然后通过文献查找这些碳源对土壤微生物的生长抑制率,选择抑制率最高的作为生长培养基中的碳源。同时,从 NCBI 数据库中检索目标菌或亲缘关系与目标菌相近的微生物的基因组信息,从中查找抗生素抗性基因,将与抗性基因相对应的抗生素添加到生长培养基中。如此以碳源和抗菌物质作为双重限制因素,

将其添加至基础无机盐溶液中即构成分离目标微生物的生长培养基。运用 SMART 方法,研究人员设计出了针对荚壳伯克氏菌(*Burkholderia glumae*)、燕麦食酸菌(*Acidovorax avenae*)、果胶杆菌(*Pectobacterium carotovorum*)、茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)和野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)等 5 种植物病原菌的选择性培养基,这些培养基能够从土壤中特异性的分离出目标细菌,而抑制其他细菌的生长。并且这种培养基设计方法,也可用于其他一些生态学和病理学的研究。

琼脂对某些微生物具有毒害作用,采用其他的凝固剂代替常用的琼脂也可以增加微生物的可培养性。结冷胶(*Gellan Gum*)是鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas spp.*)产生的一种胞外多糖,由于其透明度较琼脂更好,以结冷胶代替常用的琼脂有助于一些微型菌落的发现,并能促进一些会被琼脂所抑制的微生物的生长^[33]。Tamiki 等^[34]的研究表明,结冷胶培养基上的菌落形成单位(*Colony-Forming Unit, CFU*)数量较琼脂培养基上多 10 倍,其中大约 60% 为新种,这个比例较琼脂培养基上多 2 倍。而且,在相同条件下,结冷胶培养基上分离到的新种微生物仅有约 1/2 能在琼脂培养基上形成菌落。但在土壤放线菌的分离中,结冷胶培养基和琼脂培养基上分离到的放线菌种类少有重叠,预示着这两种培养基可能可以用于分离不同的放线菌^[35]。

3.2 生长条件的改进

生长缓慢、被一些快速生长微生物产生的毒性物质所抑制、不同土壤层次含氧量不同而培养环境氧含量单一等是造成许多土壤微生物不能被分离的重要原因。因此,在分离培养过程中充分考虑这些实际情况并制定相应的策略,能够提高土壤微生物的可培养性。

(1) 延长培养时间:将培养时间从原来的 1~7 天延长至 5~12 周甚至更长,能够增加环境中数量不占优势的微生物和一些机会生长菌的分离成功率。在一项长达 18 个月的土壤微生物分离研究中, Buerger 等^[29]认为发现新微生物的可能性与培养时间长短之间并没有显著的关联性,培养早期和培养晚期发现微生物新种的几率是一致的,延长培养时间并不能增加发现微生物新种的几率。但研究也同时发现,在 18 个月的培养时间里,菌落数确实是随着时间增加而呈梯度增加的,在第 18 个月之后菌落数较第 1 个月增加了 700 倍,并且延长培养时间

能有效提高一些数量较少的菌和机会生长菌的生长效率。

(2) 改善培养环境中的含氧量: 在土壤微生物分离培养过程时, 应根据土壤样品微环境中的含氧量选择培养体系中的通气条件, 如正常空气、低氧空气或无氧空气。Janssen 等^[36]采用无氧培养基从缺氧水稻土壤中成功分离到了疣微菌目 (*Verrucomicrobiales*) 的 3 个耐氧性厌氧超微细菌。在一项意在探寻甲烷菌在天然有氧条件下是否能产生甲烷的研究中, 研究者打破常规的无氧培养条件, 在模拟自然条件的情况下进行多因素实验, 发现了两株在有氧条件下也能产生甲烷的细菌, 甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina*) 和甲烷囊菌 (*Methanocella*)^[37]。

(3) 降低培养温度: 在微生物生长过程中, 因生存竞争的需要会通过代谢产生抑菌物质, 抑制环境中其他竞争性微生物的生长以获得更多的生存资源。在最适的生长温度下, 这些微生物会大量繁殖, 抑制其他微生物的生长, 如在分离过程中降低培养温度, 抑制情况则会得到缓解。在一项温度对土壤细菌和真菌生长速率影响的研究中, 研究人员发现土壤细菌和真菌在 25 ~ 30℃ 的生长活性是最好的^[38], 这明显低于通常的细菌培养温度, 而且真菌比细菌更容易适应低温生长条件。这项研究还发现, 土壤微生物呼吸速率是随着培养温度的提高而增加的, 45℃ 较 0℃ 时增加了 70 倍 ~ 120 倍。

3.3 天然环境原位培养

由于难以在实验室中完全复制微生物生长的天然环境条件, 导致其生长过程中需要的某些营养因子缺乏或与其他生物的生态关系被破坏, 而使得许多微生物在人工培养基上难以生长。如能将培养体系与天然环境相连通, 则有助于微生物的分离培养。

2002 年, Epstein 和 Lewis 团队设计了一种“扩散盒 (Diffusion Chamber)”的装置用于培养海洋潮汐带沉积物中的微生物^[39]。“扩散盒”主体为钢制垫圈, 两侧用半透膜密封, 中间半固体培养基上接种海洋稀释物悬浮液, 半固体培养基和顶部半透膜之间留有狭小的空间容纳空气。然后将其置于注满新鲜海水的水族箱里, 其中加有样品来源的天然海洋沉积物、采样地水草、贝壳等以尽量保持原有生态环境, 培养期间不断更换新鲜海水。采用这一方法, 可以使样品中 40% 的微生物形成微菌落, 而常规平板培养法仅有 0.05%, 并且在“扩散盒”里生长的微菌落中大部分 (86% ± 7%) 不能在常规平板

上生长。

随后, 这一方法用于分离被放射性物质、重金属等污染的土壤中的微生物^[40]。研究中采用“扩散盒”培养法和常规平板培养法总共分离到了 58 个种的 71 个菌株, 其中 50 个种的 61 个菌株是通过“扩散盒”培养法分离的。并且在常规培养法中分离到的菌株除了 1 种之外, 其余的全部能够在“扩散盒”培养法中分离到。在这一系统中, 即使不添加任何营养物, 也同样可以用于土壤微生物的分离^[41]。

“扩散盒”经改进后称为“原位培养陷阱 (Trap for *In Situ* Cultivation)”, 被用来选择性分离放线菌和丝状真菌^[35]。这一装置在结构与“扩散盒”相似, 只是底部的半透膜孔径为 0.2 ~ 0.6 μm, 孔径加大是为了有利用放线菌和丝状真菌的菌丝体穿过半透膜进入到生长盒中。“原位培养陷阱”和“扩散盒”在原理上也略有差异, 在使用的过程中, “原位培养陷阱”的生长盒并不事先接种, 而是直接将培养装置的底部半透膜与湿润的泥土或淤泥样品紧密接触, 环境样品中的放线菌和丝状真菌的菌丝体能够延伸穿过半透膜进入到生长盒中, 而细菌和单细胞真菌不能进入。如果将底部半透膜孔径缩小到只有 0.2 μm, 则只有丝状真菌能够进入生长盒。这一装置与常规平板培养相比较, 分离到的放线菌和真菌多样性更丰富。

3.4 群体培养和共培养技术

2011 年, Dubey 和 Ben-Yehuda 和对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的种间和种内的相互交流情况进行了研究^[42]。研究发现, 这几种细菌无论是在种内还是种间均会形成一种纳米管 (Nanotubes), 利用这种纳米管, 可以在这几种细菌间进行荧光物质、抗生素抗性物质和非接合性质粒的交流。除此之外, 微生物之间还可以通过分泌胞外小分子自诱导素和信号寡肽、形成胞外膜泡等^[43]方式进行交流。

在自然环境中, 微生物群体之间的这种代谢物质与信号分子的联系和交流同样存在, 其作用主要有两种: 竞争有限的生存资源, 相互协作以适应环境^[20-21]。典型的例子是生物膜群体, 复杂的胞间交流决定了生物膜的结构、成熟、微生态位的构建乃至促进其中个体的生存和繁殖^[44]。而纤维素的生物降解和复杂有机物生物转化为甲烷则是微生物群体协作的经典范例^[45]。微生物的群体协作方式之一是通过共享代谢中间物、微量营养元素或螯

合剂等来辅助群体成员生长,如果能够将这些物质鉴定出来,则在培养过程中添加进去就可以对这个群体中的任何一个成员进行单独培养。但也有些微生物并不是简单地添加某些化合物就可将其分离出来的,这些微生物之间的协作往往涉及到能量代谢,因此只能通过群体培养(Community Culture)的方式进行分离。如 Plugge 和 Stams 等^[46]采用透析膜反应器进行群体培养,使无氧污泥中以谷氨酸盐为唯一碳源和能源的嗜热互养厌氧微生物群在一年的时间内富集了 400 倍,并在反应器运行两年之后,成功地分离并鉴定了其中的两种优势菌。

共培养技术(Co-Culture)可以看做是群体培养的简化版,是指某些微生物需要在其他微生物即辅助菌(Helper)的附近才能生长,一旦远离或缺少辅助菌就不能被培养。其原因可能是这些微生物以特异辅助菌的存在作为环境适合生存的信号^[47]或是通过辅助菌的作用为其提供某些生长必需物质。共培养技术的关键是将待分离样品和辅助菌接种在同一个平板或能够进行细胞间交流的体系中。Epstein 和 Lewis 等在“扩散盒”分离研究中发现,从“扩散盒”中分离到的很多细菌只有当它们与来自同一环境的其他细菌靠近时才能在平板上生长^[39],证明了这些细菌的共培养依赖性。D'Onofrio 等^[48]在一项针对沙质潮间带生物膜细菌的分离研究中发现,细菌 *Maribacter polysiphoniae* KLE1104 除了在来自同一环境的细菌辅助下生长,也能以大肠杆菌作为辅助菌。然后他们利用大肠杆菌突变体对辅助机理进行研究,发现肠菌素(Enterobactin)合成途径相关基因被敲除的大肠杆菌不能诱导 KLE1104 的生长。肠菌素是一类能促进 Fe_2O_3 溶解的分泌性小分子物质,能使 Fe^{3+} 转变为 Fe^{2+} ,为 KLE1104 所利用。研究还发现,在培养体系中加入还原性 Fe^{2+} ,使得其他许多辅助菌依赖性细菌也能够独立生长。显然,这些依赖辅助菌才能生长的微生物在一些与生长相关的必需功能上发生了缺失^[47],如使不可溶的 Fe^{3+} 转变为可溶,而在平板上单独培养时如没有辅助菌则因这些功能的缺失而不能生长。

3.5 非培养法辅助分离

非培养技术(Culture-Independent Methods)与分离培养方法的联合使用可以更全面地阐明某些特定土壤环境中具有特定功能的微生物群体组成。Ferrari 和 Gillings 等^[49]采用“扩散盒”结合免疫荧光活体染色(Immunofluorescent Viability Staining)和

针对目标活体微生物和微菌落的微操作技术(Micro-manipulation)从土壤样品中分离到了一些难培养和新类型的微生物,包括之前从未能在宿主体外培养的棒状杆菌科的革兰氏阳性植物病原菌 *Leifsonia xyli*。在一项针对水稻土壤 N_2O 还原微生物的研究中,研究人员同时采用了培养法和非培养法^[50]。在培养法中,采用功能性单细胞(Functional Singal Cell, FSC)分离技术^[51]即微生物被培养在能够对 N_2O 还原和存在细胞分裂抑制剂的条件下,然后通过显微操作技术将能够对 N_2O 进行还原的微生物转移到低营养培养基上进行培养和鉴定。在非培养法中,他们通过稳定同位素标记(Stable Isotope Probing, SIP)技术对还原过程中的电子供体琥珀酸盐进行¹³C 标记,并将其与 N_2O 一起或单独用于 N_2O 还原菌的研究。通过“重”DNA、“轻”DNA 的密度梯度分离及其 16S rRNA 基因的变性梯度凝胶电泳(DGGE)对还原菌群体进行了分析。结合培养法和非培养法的分析结果发现在水稻土壤中 N_2O 还原菌主要属于伯克氏菌目(*Burkholderiales*)草螺菌属(*Herbaspirillum*)和红螺菌目(*Rhodospirillales*)固氮螺菌属(*Azospirillum*)。

在环境微生物的宏基因组学和宏蛋白质组学研究中所获得的序列信息和分析结果可以帮助设计更好的培养策略用于微生物的纯培养分离。一个典型的例子就是 Banfield 研究团队对一处地下酸性矿山废水(Acid Mine Drainage, AMD)生物膜群体的宏基因组学和宏蛋白质组学研究及其在关键固氮微生物分离中的应用^[52-54]。首先该团队采用鸟枪法对 AMD 嗜酸生物膜进行宏基因组测序及单基因组重建与分析^[52]。在这一研究中,他们重建了两个几乎完整的基因组序列和三个部分基因组序列,并通过重建的基因组序列分析了生物膜固碳、固氮和产生能量的途径。研究发现该生物膜为处于地下深处的自养群体,外界没有明显的固定态碳和氮的输入,生物膜中优势菌群为钩端螺旋菌属 II 群(*Leptospirillum* Group II),但 II 群的基因组序列中没有固氮基因,而在 III 群的基因组中发现了与氧化亚铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferrooxidans*)相似的固氮基因操纵子 *nif*,因此推测数量较少的钩端螺旋菌属 III 群在该嗜酸生物膜生态系统中起着关键的固氮作用。固氮基因 *nif* 表达的蛋白在该生物膜的宏蛋白质组学分析中也得到了证实^[53]。此外,宏基因组学和宏蛋白质组学分析均显示该群体的能量为通过氧化亚铁离子获得。根据这些信息,研究

团队设计了一种无氮源、以 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为主要能源的酸性培养基,通过梯度稀释法分离到了这种化能无机自养型微生物,经鉴定为钩端螺旋菌属新种 *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov.^[54]。

4 结 语

土壤作为微生物的大本营,其中蕴含着地球上最为多样的微生物种群,土壤微生物的研究与开发以前是,将来也应该是天然产物开发的主要来源,但如何开发是微生物研究者们面对的一个最大的难题。非培养法包括宏基因组学、宏蛋白质组学、宏转录组学等“宏-组学”的发展毫无疑问为这个难题的解决提供了强有力的工具和有效的研究手段,但具体的生物化学、生理学和遗传学功能的研究仍然有赖于微生物的分离和培养^[55]。而近年来微生物分离培养技术的探索和突破,将有助于更多的未知微生物和未培养微生物被分离出来,分离培养技术与“宏-组学”技术一起将为微生物学的更大发展提供助力。

在未来的土壤微生物研究中,分离培养技术的发展应重点关注以下几个方面:

(1)土壤微生物相互作用方式的进一步阐明。在土壤这样一个复杂系统中,微生物如何获取与生存相关的信息,与其他微生物是否以及如何进行交流,新信息分子的寻找等领域的突破将使土壤微生物的分离培养及群体培养和共培养技术得到新的发展。

(2)继续研究和开发新的土壤微生物高效分离方法,尤其是高通量的分离方法,如基于渗透性中空纤维膜盒(Hollow-Fiber Membrane Chamber, HFMC)的毛细管分离系统^[56]和高通量分离芯片^[57]。这两种方法均属于天然环境原位培养技术如“扩散盒”的延伸,但在培养效率上面要高得多,分离到新种微生物的机会也更大。高效分离方法的开发将使我们能够更好地利用土壤微生物丰富的多样性。

(3)设计开发新的分离培养基,建立与微生物种属关联的分离培养基数据库。分离培养基的化学组成是影响微生物生长的关键条件,其中生长因子的添加和生长抑制物质的排除对于分离而言至关重要,因此应进一步探索微生物生长条件,设计开发适合新种微生物分离的培养基。此外,在现有培养基和已知微生物生长条件的基础上,将分离培

养基与微生物种属关联并进行更加细致的分门别类,建立与种属关联的分离培养基目录或专门的数据库,将使我们在土壤及其他环境微生物的分离上更加方便高效。

(4)特殊土壤生境中微生物的分离技术。本文所指的特殊生境包括常规意义上的极端环境和其他一些地理位置或理化因素特殊的环境如重金属污染的土壤等,如何分离极端微生物是对现代微生物分离技术的挑战。其他一些理化因素特殊的环境微生物的分离对于环境的修复治理和环境资源的开发利用也将具有重要意义,如从高硒土壤中进行富硒微生物的普查和筛选有助于获得转化效率更高的富硒菌种和开发更多的硒的微生物转化产品^[58],也有助于高硒土壤的治理和开发。

参 考 文 献

- [1] Daniel R. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 470—478
- [2] 贺纪正,袁超磊,沈菊培,等. 土壤宏基因组学研究方法与进展. *土壤学报*, 2012, 49(1): 155—164. He J Z, Yuan C L, Shen J P, et al. Methods for and progress in research on soil metagenomics (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49(1): 155—164
- [3] Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek M H, et al. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 4215—4224
- [4] Roesch L F, Fulthorpe R R, Riva A, et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 2007, 1(4): 283—290
- [5] Pham V H, Kim J. Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30(9): 475—484
- [6] Handelsman J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(4): 669—685
- [7] Wilmes P, Bond P L. Metaproteomics: Studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(2): 92—97
- [8] Carvalhais L C, Dennis P G, Tyson G W, et al. Application of metatranscriptomics to soil environments. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 91(2): 246—251
- [9] Castro A P, Sartori D M, Quirino B F, et al. Combining “omics” strategies to analyze the biotechnological potential of complex microbial environments. *Current Protein & Peptide Science*, 2013, 14(6): 447—458
- [10] Segata N, Boernigen D, Tickle T L, et al. Computational meta-omics for microbial community studies. *Molecular Systems Biology*, 2013, 9(1): 666
- [11] Cardenas E, Tiedje J M. New tools for discovering and character-

- izing microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(6): 544—549
- [12] Chistoserdov L. Functional metagenomics: recent advances and future challenges. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 2010, 26: 335—352
- [13] Henry C S, Overbeek R, Xia F, et al. Connecting genotype to phenotype in the era of high-throughput sequencing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1810(10): 967—977
- [14] 涂晨, 骆永明, 马露瑶, 等. 分子生物学与系统生物学技术在土壤污染微生物生态研究中的应用. *土壤学报*, 2013, 50(3): 609—617. Tu C, Luo Y M, Ma L LY, et al. Applications of molecular and systematic biological technologies in polluted soil microbial ecology researches (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50(3): 609—617
- [15] 全哲学. 追寻被“遗漏”的微生物. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 34—43. Quan Z X. Seeking of “missed” microorganisms (In Chinese). *Microbiology China*, 2013, 40(1): 34—43
- [16] Green S J, Prakash O, Gihring T M, et al. Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediment exposed to mixed contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(10): 3244—3254
- [17] 王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 6—17. Wang B J, Liu S J. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms (In Chinese). *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6—17
- [18] 郭斌, 吴晓磊, 钱易. 提高微生物可培养性的方法和措施. *微生物学报*, 2006, 46(3): 508—511. Guo B, Wu X L, Qian Y. Approaches for increasing the culturability of microorganisms (In Chinese). *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(3): 508—511
- [19] 叶姜瑜, 罗固源. 微生物可培养性低的生态学释因与对策. *微生物学报*, 2005, 45(3): 478—482. Ye J Y, Luo G Y. Ecological interpretation and related strategies for low culturability of microorganisms (In Chinese). *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(3): 478—482
- [20] Nadell C D, Xavier J B, Foster K R. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Review*, 2009, 33(1): 206—224
- [21] West S A, Diggle S P, Buckling A, et al. The social lives of microbes. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 2007, 38: 53—77
- [22] Hughes D T, Sperandio V. Inter-kingdom signaling: Communication between bacteria and their hosts. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6: 111—120
- [23] Bruns A, Cypionka H, Overmann J. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central baltic sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3978—3987
- [24] Castro H F, Classen A T, Austin E E, et al. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(4): 999—1007
- [25] Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(3): 240—245
- [26] Janssen P H, Yates P S, Grinton B E, et al. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(5): 2391—2396
- [27] Stevenson B S, Eichorst S A, Wertz J T, et al. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4748—4755
- [28] Emenjerg M, Kishony R. Distinct growth strategies of soil bacteria as revealed by large-scale colony tracking. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(5): 1345—1352
- [29] Buerger S, Spoering A, Gavrish E, et al. Microbial scout hypothesis and microbial discovery. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3229—3233
- [30] Vaninsberghe D, Hartmann M, Stewart G R, et al. Isolation of a substantial proportion of forest soil bacterial communities detected via pyrotag sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(6): 2096—2098
- [31] Hamaki T, Suzuki M, Fudou R, et al. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99(5): 485—492
- [32] Kawanishi T, Shiraishi T, Okano Y, et al. New detection systems of bacteria using highly selective media designed by SMART: Selective medium-design algorithm restricted by two constraints. *Public Library of Science One*, 2011, 6(1): e16512. DOI: 10.1371/journal.pone.0016512
- [33] Kamagata Y, Tamaki H. Cultivation of uncultured fastidious microbes. *Microbes and Environments*, 2005, 22(2): 85—91
- [34] Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, et al. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 2162—2169
- [35] Gavrish E, Bollmann A, Epstein S, et al. A trap for in situ cultivation of filamentous actinobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 72(3): 257—262
- [36] Janssen P H, Schuhmann A, Mörschel E, et al. Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the *Verrucomicrobiales* lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(4): 1382—1388
- [37] Angel R, Matthies D, Conrad R. Activation of methanogenesis in arid biological soil crusts despite the presence of oxygen. *Public Library of Science One*, 2011, 6(5): e20453. DOI: 10.1371/journal.pone.0020453
- [38] Pietikäinen J, Pettersson M, Bååth E. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 52(1): 49—58
- [39] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein S S. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 2002, 296(5570): 1127—1129

- [40] Bollmann A, Palumbo A V, Lewis K, et al. Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (22): 7413—7419
- [41] Ferrari B C, Binnerup S J, Gillings M. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (12): 8714—8720
- [42] Dubey G P, Ben-Yehuda S. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, 2011, 144(4): 590—600
- [43] Ng W L, Bassler B L. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43: 197—222
- [44] Alain K, Querellou J. Cultivating the uncultured: Limits, advances and future challenges. *Extremophiles*, 2009, 13 (4): 583—594
- [45] Brenner K, You L, Arnold F H. Engineering microbial consortia: A new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(9): 483—489
- [46] Plugge C M, Stams A J. Enrichment of thermophilic syntrophic anaerobic glutamate-degrading consortia using a dialysis membrane reactor. *Microbial Ecology*, 2002, 43(3): 378—387
- [47] Stewart E J. Growing unculturable bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(16): 4151—4160
- [48] D'Onofrio A, Crawford J M, Stewart E J, et al. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chemistry & Biology*, 2010, 17(3): 254—264
- [49] Ferrari B C, Gillings M R. Cultivation of fastidious bacteria by viability staining and micromanipulation in a soil substrate membrane system. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(10): 3352—3354
- [50] Ishii S, Ohbo H, Tsuboi M, et al. Identification and isolation of active N₂ O reducers in rice paddy soil. *The ISME Journal*, 2011, 5(12): 1936—1945
- [51] Ashida N, Ishii S, Hayano S, et al. Isolation of functional single cells from environments using a micromanipulator: Application to study denitrifying bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4): 1211—1217
- [52] Tyson G W, Chapman J, Hugenholtz P, et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 2004, 428(6978): 37—43
- [53] Ram R J, Verberkmoes N C, Thelen M P, et al. Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science*, 2005, 308(5730): 1915—1920
- [54] Tyson G W, Lo I, Baker B J, et al. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(10): 6319—6324
- [55] Morles S E, Holben W E. Linking bacterial identities and ecosystem processes: Can 'omic' analyses be more than the sum of their parts? *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 75(1): 2—16
- [56] Aoi Y, Kinoshita T, Hata T, et al. Hollow-fiber membrane chamber as a device for in situ environmental cultivation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3826—3833
- [57] Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg E M, et al. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable" microbial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2445—2450
- [58] 刘建华, 田成, 吴永尧. 微量元素硒的微生物转化研究进展. *湖北民族学院学报:自然科学版*, 2006, 24(3): 288—291. Liu J H, Tian C, Wu Y Y. Study progress of trace element selenium on microbial transformation (In Chinese). *Journal of Hubei Institute for Nationalities; Natural Science Edition*, 2006, 24(3): 288—291

PROGRESS IN CULTIVATION RESEARCH ON SOIL MICROBES

Yuan Zhihui^{1,2} Wang Jian¹ Yang Wenjiao¹ Wu Yongyao^{1†}

(1 College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410000, China)

(2 Department of Life Sciences and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou, Hunan 425199, China)

Abstract Soil is probably the most challenging of all natural environments for microbiologists, and the hotspot for discovering of novel biomolecules and genetic resources. Cultivation of environmental microorganisms was ignored and marginalized in the tremendous progress of “meta-omics” technologies. Nevertheless, by cultivation-based approaches, researchers can acquire novel microorganisms that are undetected by molecular methods, be allowed for the verification and testing of hypotheses of metabolic potential and function of novel genes determined by the meta-omic data and also do the microbial foundational research or industrial production. In the era of meta-omics, cultivation method is still useful in understanding the detailed metabolism and functions of those environmental organisms, and this makes the genetic manipulation, confirming certain functions, and the research of environmental function of microorganisms possible. The challenge is to bring these recalcitrant microorganisms into the laboratory for future exploration. This review summarizes the reasons why microbes are not growing in the lab such as. Then we focus on the advanced cultivation techniques. The methods of

modifications to growth media include using low substrate concentrations, adding growth-limiting factors into media and changing gelling reagents. Modifications to growth conditions include extending incubation time, incubating in a optimum oxygen level, and using low-temperature strategies. The strategies of cultures *in situ* or cultures in simulated natural conditions include “growth chamber” and “trap for *in situ* cultivation”. The methods of community culture and co-culture also elevated the possibility of novel bacteria from environmental samples. Cultivation of soil microorganisms by assistance of culture-independent methods such as metagenomics and metaproteomics have been developed to improve the cultivating process. Finally, we propose the directions of isolation of soil microbes in the future.

Key words Soil microbes; Uncultured microbes; Novel cultivation methods

(责任编辑:卢 萍)