

微生物可培养性低的生态学释因与对策

叶姜瑜 罗固源

(重庆大学城市建设与环境工程学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室 重庆 400045)

摘 要 纯培养技术一直是微生物学研究的基石,但其单一的营养结构和生境与自然环境中微生物多样性、协同代谢等明显矛盾,从而成为部分微生物难以复苏的主要障碍。细菌共同协作的自然生存方式的崩溃、生境的极度营养变化和生态位巨变等是微生物可培养性低的主要生态学原因。非培养技术、加富培养、混合培养、稀释培养、模拟自然培养和综合方法等是主要的研究手段和策略,可在不同程度上解决微生物可培养性低的缺陷和问题。

关键词 微生物多样性 可培养性 培养技术 未培养微生物

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)03-0478-05

纯培养技术在实验室里被频繁和常规地用于分离、纯化、活细胞计数和培养微生物,一直是微生物学研究的基石。不过,许多微生物在营养培养基中可培养性太低,不能被分离纯化的缺陷严重地制约了对微生物多样性的深入研究,从而引起微生物学家的高度重视。Staley 和 Konopka(1985)创造了一句名言:“伟大的平板,计的数太偏”(The great plate count anomaly)^[1]就是对环境中微生物实际数量同平板菌落计数之间巨大差异的最好描述。本文将就微生物可培养性低的生态学因素进行分析,并对增进可培养性的研究策略和方法进行探讨。

1 微生物多样性与低可培养性(Low culturability)

微生物自然生存环境的复杂多变,造就了微生物的自然多样性,包括结构多样性、代谢多样性、行为多样性、进化多样性和生态多样性。科学家根据现有的科学证据推测微生物种类数目应该在 $10^5 \sim 10^6$ ^[2],然而使用传统微生物学培养技术对不同生境微生物可培养性的测定来看,海水中微生物的可培养性约为 0.001% ~ 0.1%,淡水约为 0.25%,土壤约为 0.3%,活性污泥为 1% ~ 15% 左右^[3]。许多实验室证实有些微生物处于一种活的但不可培养(Viable but nonculturable, VBNC)状态,至少有 16 个属的 30 种细菌被报道有此现象发生^[4]。被文献描述过的原核生物仅有 5000 种左右,这也就是意味着所知细菌可能仅占环境细菌多样性的 1% ~ 2% 或者更少^[5]。

此外,微生物学研究也仅聚焦在极少种类上^[6]。在 1991 到 1997 年间,已正式报道的细菌种类中,有 17.5% 几乎没有被什么研究报告涉及,另外的 50% 被研究和发表的几率也非

常低,其中部分原因也同一些细菌难培养有关。显然这是对自然界微生物多样性的一种扭曲性描述。因此,纯培养技术的局限性已经成为了研究微生物自然生态和多样性的主要瓶颈^[1,7]。

2 微生物复苏障碍的生态学释因

很多年来,细菌可培养性的巨大差异一直困惑着许多学者,同属 *Proteobacteria* 纲, α 亚纲和 γ 亚纲细菌形成菌落的能力差异就非常大^[8]。对可培养性太低的原因有过很多解释:死的和垂死的细胞不可能形成菌落,病毒浸染和营养饥饿可能是低成活率的原因,细菌细胞不同的生理状态(如休眠和 VBNC 状态)可能是可培养性低的因素^[9],渗透压变化的冲击也可能是细菌细胞失活的原因^[10]等等。实际上,当微生物暴露到新的生境时自然会面临新的生存压力,许多生态学因素也是造成其可培养性低的重要原因。

2.1 共同协作的自然生存方式的崩溃

在自然生态环境中,微生物种群常以一些很特殊的方式排列(如生物膜、协同代谢、信号传导被很多科学家所证实^[11]),这样群落才有活性,而靠单独种类的微生物是不能获得的。互养(Syntrophism)、共代谢(Co-metabolism)等方式是微生物在自然界中重要的生存模式之一,共栖、互生、共生等便是微生物自然生态关系中共同协作生存方式的不同层次。同一生境的微生物之间联系千丝万缕,细胞与细胞之间有着广泛的通讯和联系,在大多数饥饿状态下微生物基因表达所涉及的 cAMP、大多数革兰氏阴性菌中的群体感应调节系统(Quorum Sensing)的酰基高丝氨酸环内酯(N-acyl homoserine lactones, AHLs)分子等都可能是细胞之间沟通的信号分

基金项目:国家自然科学基金(50378095);重庆大学骨干教师基金(716411045)

作者简介:叶姜瑜(1963-),男,四川省青川县人,副教授,在职博士研究生,主要从事微生物生态学及环境微生物学研究。Tel: 86-23-68252137; E-mail: yejy@swnu.edu.cn

收稿日期: 2004-09-20, 修回日期: 2005-01-10

子^[12,43],这些正在被微生物学的不断发展所证明。

2.2 生境的极度营养变化

现存的任何有机体都是长期自然适应和进化的结果。一些细菌选择了快速生长、仰赖高繁殖率的 *r* 生长策略;另外一些则选择了对环境资源高亲和性的 *K* 策略,适应低营养含量和极低的生长率。突然的纯培养环境、极度营养变化凸现许多细菌基因型的固有结构缺陷,甚至可能成为主要生长障碍^[14],特别是贫营养水体中的微生物和那些 *K* 策略者,它们大多数有高效的丙氨酸运输系统^[15],而缺乏对一些关键代谢中间物(如琥珀酸)的运输系统,以此避免在高度贫营养环境中代谢物泄漏。所以,对这些微生物提供营养成分丰富的培养基反而成为阻碍其复苏的重要因素,甚至出现底物加速的死亡(Substrate-accelerated death)^[16]。

然而,纯培养又很难提供对许多细菌潜在重要的外源活性物质,比如在海水或淡水中 ATP 的浓度可达 1nmol/L,很可能源自浮游植物和其它浮游生物^[17],许多水生细菌离不开藻类分泌的生长因子和维生素^[18],植物、动物病原菌对寄主活性物质的依赖等都是传统纯培养法难以提供的。

2.3 急剧改变的生态位

微生物自然群落存在着演替和波动,大多数微生物的复苏不仅需要提供天然样本中的营养物质,还需要提供其群落中的小生境,即生态位(Niche)^[11]。自然界中的大部分微生物从其原生环境中被带走时就会萎缩、凋谢,极微小的变化都有可能使其丧失生态位和生活力^[7,9],从而难以在人工条件下完全复苏或可培养性很低。此外,高种群多样性(High species diversity)和低种群多样性(Low species diversity)微生物的生态位需求差异很大。所以从生态角度上看,对大多数微生物而言,分离、纯化培养微生物本身就是一种生态灾难,不能适应而难以复苏和形成菌落也就理所当然。

3 解决可培养性太低的策略及方法

微生物学家采用过许多策略和手段来解决增强微生物可培养性的问题,如自然培养、加富培养、连续培养等,Winogradsky(1856~1953)很早就建立 Winogradsky Column 用来富集和研究硫化细菌和硝化细菌,成为微生物富集培养(Enrichment culture)的先锋^[19]。随着研究的日益深入,针对微生物可培养性的策略和方法也得到了一定的发展和完善。

3.1 非培养技术—跨越纯培养技术的策略

利用分子技术研究自然生境中微生物多样性的非培养法(Culture-independent method)被越来越多地使用^[2],在很大程度上跨越了遏制微生物研究必须纯培养这个瓶颈,不断地揭示出自然界新的 16S rRNA 序列类型。在 40 个细菌类群中约 1/3 的类群是完全由未培养细菌组成的,仅以 16S rRNA 序列方式被记录下来^[20]。非培养法替代培养法比较微生物群落的组成、多样性和结构正在形成趋势。同时,收集所研究环境中不可培育微生物全基因组序列的宏基因组学

(Metagenomics)逐渐形成^[21,22],它可以提供比可培养微生物大得多的遗传信息,Streit 等(2004)认为这对研究未培养微生物是关键的方法^[21],是一项很有前途的生物学技术^[22]。

不过,一些微生物学家仍然认为“微生物学是关于有机体的科学”。使用 rDNA 系列资料作为建立分类单元或某个分子标记用于细菌系统发生关系的信息时,人造假象的产生会凸现此类研究的冒险性,这些类群的形态、生理代谢、遗传和生态功能等方面的知识仅是靠推测获得。因此,他们认为需要重申多相分类法(Polyphasic taxonomy)的价值,分子生物学资料应只是其它信息(如表型)的补充而不是完全替代^[6,23]。

3.2 加富培养策略

在基础培养基上增加额外营养成分形成加富培养基(Enrichment medium)是最常用的培养基设计策略。针对不同的微生物生理类群,所添加的特殊营养物质包括血液、血清、酵母浸膏、动植物组织液和土壤浸出液等一切目的微生物可能需要的营养物,用来培养营养要求比较苛刻的异养型微生物,同时此类培养基也可被用于富集和增强特定生理类群的可培养性而类似于选择培养基^[24]。

3.3 混合培养策略

自然微生物群体通常混合共存于环境中,不少工业过程也采用混合培养(Mixed culture),如酿造与污水生物处理。在环境大分子有机物的降解过程中,单一菌株的培养往往会失败,常采用多种细菌的混合培养策略。从除草剂异丙隆(Isoproturon)污染土壤中富集培养得到了 SRS1 和 SRS2 菌株,将其共培养(Co-culture)时生长率、降解性都比单独培养时高许多。深入研究发现,SRS1 为 SRS2 提供了生长必不可少的氨基酸,成为后者可培养性提高的物质基础^[25]。Tsigarida 等(2003)利用单独培养、共培养和混合培养对 *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta* 和 *Pseudomonas* sp. 进行组合研究后发现,细菌共栖培养时不仅生长率提高了,末端代谢产物类型也发生了改变^[26]。这些都说明混合培养能提供微生物在纯培养时无法获得的物质流,是其能增强微生物可培养性的重要原因;从另一侧面也反映出纯培养的微生物实际上已不再是原生态的真实面貌和反映了。

3.4 稀释培养策略

地球上广泛分布着长期适应贫营养环境的细菌,此类细菌对过高的盐类和有机物敏感,营养基质会造成它们复苏障碍,因此常采用将营养基质稀释 100 倍的稀释培养法(Dilution culturing)^[16]来培养它们,甚至直接采用原生态水作为培养基^[27]。Franklin 等(2001)采用从原液到 10⁻⁴ 浓度进行系列稀释培养方法来分析和重建一个污水微生物群落,发现每一个稀释梯度都会新分离到 2~3 个独特的类群^[28]。这提醒我们要充分重视自然生境中微生物的分布是随营养渐变而呈现的梯级分布,培养策略不应仅是全营养或 100 倍稀释的简单选择。

一种发展的稀释培养技术,常称为消失培养(Extinction culturing)或稀释至消失技术(Dilution-to-extinction technique)^[9],更被 Connon 等(2002)发展为高通量培养法(High-throughput culturing, HTC)用于较大样本贫营养细菌的培养和计数:首先用荧光显微镜对天然群落微生物直接计数,然后将其稀释接种到预备培养基中,终浓度为 1~5 个细胞/mL,加入 48 孔微量滴定板(1 mL/孔)中,培养一定时间后,各取 200 μ L 试剂量过滤排列在 48 片滤膜上,染色,转移到载玻片上,由荧光显微镜筛选阳性结果(即有微生物生长),最后对阳性培养物进行 PCR、RFLP 和测序鉴定,转移到新鲜培养基中或者将培养物保藏等。通过 3 年 11 次采样培养,同传统富营养平板相比,该法微生物可培养性高于对照 1.4~120 倍^[29]。在极低营养基质上,利用该法分离到了 44 株 *γ -proteobacteria* 新菌株,分属于 5 个 rRNA 进化枝^[30]。Simu 等(2004)利用 96 孔微量滴定板进行消失培养,筛选阳性菌株;阳性菌株再进行富营养和海水培养对照试验,将不能形成菌落者滴加到海水琼脂载片(含有荧光染料 DAPI)上进行生长行为观察。他们发现,虽然有 3 株没有形成菌落的行为,但它们仍然有促进生长和分布的行为,可以在琼脂表面上形成由数个细胞组成的、显微镜可见的微生物^[9]。因此,对贫营养生境的微生物,稀释培养策略应该是增强其可培养性的主要选择,消失培养技术是该思路指导下的一项针对性强、效果显著的研究方法。

3.5 模拟自然培养策略

对传统纯培养技术中微生物单一性、分离性和不可交流等特性同自然生境中微生物多样性、合作性和交流性的比较和反思后,从生态学角度出发的模拟自然培养思路便自然成为新的培养策略。DeBruyn 等(1990)使用悬浮滤膜技术(Floating-filter technique)^[31]为嗜酸、铁氧化菌株创造有益的生境,有效地增强该类菌株的可培养性。Kaeberlein 等(2002)

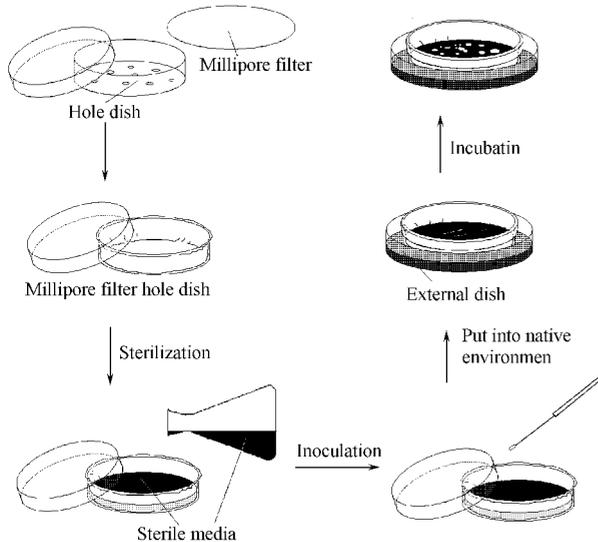


图 1 近自然纯培养法装置及操作流程

Fig. 1 Setup and flow chart of near-native pure culture technique

设计了一种称为扩散生长盒(Diffusion growth chamber)的结构,既允许营养物和内外微生物产生的活性物质透过膜进出生长盒,但细菌又不会逃逸。然后将许多这种小盒放入沙池,再用海水覆盖。这样,先前从未培养出的海滩菌株在小盒中聚集并出现纯培养,高于之前常规技术菌落数的 300 倍左右,还分离到两种以前认为是不可培养的微生物^[7]。叶姜瑜(2004)对现有纯培养装置和方法进行改进,提出了近自然纯培养法(Near-native pure culture technique)^[32]。将微生物培养在内衬有微孔滤膜(0.20 μ m ~ 0.45 μ m)的有孔培养装置(有孔培养皿、有孔试管和有孔三角瓶等)中,将该装置放入被培养微生物所需的真实环境或模拟自然生境的外皿中,让内外环境中活性物质相互渗透保持一致,保证被培养的微生物能够同原生环境交流,从而达到增强部分微生物的可培养性,甚至将部分未培养微生物转变为可培养的目的(图 1)。

模拟自然培养策略的优点在于既能纯培养又能保证微生物原生态特性在一定程度上延续,弥补了自然培养和传统纯培养的部分弱点,虽未完全成熟,但应该是未来最有潜力的培养策略之一,有许多工作值得深入开展和进行。

3.6 综合策略

希望用一种方法解决所有微生物的培养问题既不现实也不可能。Stevenson 等(2004)^[33]认为对细菌培养问题应综合考虑,如(1)在琼脂培养基仅加少量甚至不加营养物(2)相当长期的培养(超过 30d)(3)保护细胞不受外源性过氧化物的伤害(4)在生长培养基中加入腐殖酸或腐殖酸类似物、群体感应调节系统化合物(如酰基高丝氨酸环内酯类)等。利用此培养策略,他们从土壤和白蚁肠道中获得了先前认为属于不可培养细菌 *Acidobacteria* 和 *Verrucomicrobia* 的纯培养。

4 结束语

可培养性本身不是细菌细胞的特性^[34]。在一定程度上,微生物能否被培养取决于是否找到了适宜的培养方法,也有报道认为在某些环境甚至 70% 左右的细胞是可以培养的^[19]。所以,只要微生物学家和生物技术学家勇于迎接挑战,不断地深入研究,增强微生物的可培养性,把更多未培养微生物转变成成为可培养仍然是一件大有可为的工作。

参 考 文 献

- [1] Staley J T, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol*, 1985, **39**: 321-346.
- [2] Norman R P. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, **276**: 734-740.
- [3] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143-169.
- [4] Rahman M H, Suzuki S, Kawai K. Formation of viable but non-culturable state (VBNC) of *aeromonas hydrophila* and its virulence in Goldfish, *Carassius auratus*. *Microbiol Res*, 2001, **156**: 103-106.

- [5] Dianne K N , Jillian F B . Geomicrobiology : how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems . *Science* , 2002 , **296** : 1071 – 1077 .
- [6] Bull A T , Ward A C , Goodfellow M . Search and discovery strategies for biotechnology : the paradigm shift . *Microbiol Mol Biol Rev* , 2000 , **64** : 573 – 606 .
- [7] Kaeberlein T , Lewis K , Epstein S S . Isolating “ uncultivable ” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment . *Science* , 2002 , **296** : 1127 – 1129 .
- [8] Pinhasi J , Berman T . Differential growth response of colony-forming α - and γ -proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from lake Kinneret (Israel) , the eastern Mediterranean sea , and the gulf of Eilat . *Appl Environ Microbiol* , 2003 , **69** : 199 – 211 .
- [9] Simu K , Hagström Å . Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy . *Appl Environ Microbiol* , 2004 , **70** : 2445 – 2451 .
- [10] Varela C A , Baez M E , Agosin E . Osmotic stress response : quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a lysine-overproducing strain of *Corynebacterium glutamicum* . *Appl Environ Microbiol* , 2004 , **70** : 4222 – 4229 .
- [11] Costerton J W , Lewandowski Z , DeBeer D , et al . Biofilms , the customized microniche . *J Bacteriol* , 1994 , **176** : 2137 – 2142 .
- [12] Guan L L , Onuki H I , Kamino K . Bacterial growth stimulation with exogenous siderophore and synthetic N-acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions . *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** : 2797 – 2803 .
- [13] Bruns A , Heribert C , Jörg O . Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central baltic sea . *Appl Environ Microbiol* , 2002 , **68** : 3978 – 3987 .
- [14] Kalmbach S , Manz W , Szewzyk U . Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes . *Appl Environ Microbiol* , 1997 , **63** : 4164 – 4170 .
- [15] Ostrowski M , Fegatella F , Wasinger V , et al . Cross-species identification of proteins from proteome profiles of the marine oligotrophic ultramicrobacterium , *Sphingopyxis alaskensis* . *Proteomics* , 2004 , **4** : 1779 – 1788 .
- [16] Schut F , de Vries E J , Gottschal J C , et al . Isolation of typical marine bacteria by dilution culture : growth , maintenance , and characteristics of isolates under laboratory conditions . *Appl Environ Microbiol* , 1993 , **59** : 2150 – 2160 .
- [17] Bruns A , Nübel U , Cypionka H , et al . Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton . *Appl Environ Microbiol* , 2003 , **69** : 1980 – 1989 .
- [18] Atlas R M . Principles of microbiology . 1st ed . Boston : McGraw – Hill , 1995 , 525 – 528 .
- [19] González J M , Whitman W B , Hodson R E , et al . Identifying numerically abundant culturable bacteria from complex communities : an example from a lignin enrichment culture . *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** : 4433 – 4440 .
- [20] Dojka M A , Harris J K , Pace N R . Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria . *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** : 1617 – 1621 .
- [21] Streit W R , Schmitz R A . Metagenomics-the key to the uncultured microbes . *Curr Opin Microbiol* , 2004 , **7** : 492 – 498 .
- [22] Schloss P D , Handelsman J . Biotechnological prospects from metagenomics . *Curr Opin Biotechnol* , 2003 , **14** : 303 – 310 .
- [23] Vandamme P , Pot B , Gillis M , et al . Polyphasic taxonomy , a consensus approach to bacterial systematics . *Microbiol Rev* , 1996 , **60** : 407 – 438 .
- [24] Schlegel H G . 普通微生物学 . 陆卫平 , 周德庆 , 郭杰炎 , 等译 . 第一版 . 上海 : 复旦大学出版社 , 1990 .
- [25] Sørensen S R , Ronen Z , Aamand J . Growth in coculture stimulates metabolism of the phenylurea herbicide isoproturon by *Sphingomonas* sp. strain SRS2 . *Appl Environ Microbiol* , 2002 , **68** : 3478 – 3485 .
- [26] Tsigarida E , Boziaris I S , Nychas G J E . Bacterial synergism or antagonism in a gel cassette system . *Appl Environ Microbiol* , 2003 , **69** : 7204 – 7209 .
- [27] Saito A , Mitsui H , Hattori R , et al . Slow-growing and oligotrophic soil bacteria phylogenically close to *Bradyrhizobium japonicum* . *FEMS Microbiol Ecol* , 1998 , **25** : 277 – 286 .
- [28] Franklin R B , Garland J L , Bolster C H , et al . Impact of dilution on microbial community structure and functional potential : comparison of numerical simulations and batch culture experiments . *Appl Environ Microbiol* , 2001 , **67** : 702 – 712 .
- [29] Cannon S A , Giovannoni S J . High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates . *Appl Environ Microbiol* , 2002 , **68** : 3878 – 3885 .
- [30] Cho J C , Giovannoni S J . Cultivation and Growth Characteristics of a Diverse Group of Oligotrophic Marine *Gammaproteobacteria* . *Appl Environ Microbiol* , 2004 , **70** : 432 – 440 .
- [31] DeBruyn J C , Boogerd F C , Bos P , et al . Floating filters , a novel technique for isolation and enumeration of fastidious , acidophilic , iron-oxidizing , autotrophic bacteria . *Appl Environ Microbiol* , 1990 , **56** : 2891 – 2894 .
- [32] 中国专利申请 . 一种增强微生物可培养性的微孔滤膜近自然培养法及其装置 . 申请号 200410037037.8 .
- [33] Stevenson B S , Eichorst S A , Wertz J T , et al . New strategies for cultivation and detection of previously uncultured Microbes . *Appl Environ Microbiol* , 2004 , **70** : 4748 – 4755 .
- [34] Bartscht K , Cypionka H , Overmann J . Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community . *FEMS Microbiol Ecol* , 1999 , **28** : 249 – 259 .

Ecological interpretation and related strategies for low culturability of microorganisms

YE Jiang-yu* LUO Gu-yuan

(*Key Laboratory of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region of Ministry of Education, City Construction and Environmental Engineering Academy, Chongqing University, Chongqing 400045, China*)

Abstract : Pure culture technique has been a fundamental method since its invention in microbiology, but its isolated and monotonous environment contradicts microbial diversity and cooperation relationship in natural environment. And this contradiction directly results in the uncultivability of some microbes in media. From ecological viewpoint, the recovery barriers of natural microbes mainly include the crash of cooperation in natural environment, the great change of nutrient in new environment and the loss of native niche. The main methods and strategies on low culturability of microorganisms are culture-independent methods, enrichment culture, mixed culture, dilution culture, simulating nature culture and synthetic method, which can to some degree compensate for the traditional approach and improve the low culturability of some bacteria.

Key words : Microbial diversity, Culturability, Culture technique, Nonculturable microorganism

Foundation item :National Natural Science Foundation of China(50378075)

* Corresponding author. Tel : 86-23-68252137 ; E-mail : yejy@swnu.edu.cn

Received date 09-20-2004