

提高微生物可培养性的方法和措施

郭 斌, 吴晓磊*, 钱 易

(清华大学环境科学与工程系 水污染控制与模拟国家联合重点实验室 北京 100084)

摘 要: 目前自然界中只有极少部分微生物能够得到培养, 严重阻碍了对微生物生命活动规律的研究和微生物资源的开发。改进传统培养方法, 采用新型培养技术, 提高微生物可培养性, 大量培养自然界中存在的微生物, 从而更全面、准确地了解微生物细胞的生命规律、获悉微生物群落中各种微生物之间的动态相互作用和相互协调的规律, 对环境微生物工艺进行准确地设计、精细地调控和高效地利用。简要介绍了微生物不可培养的原因, 系统总结了有关提高微生物可培养性方法的最新研究进展, 提出研究中存在的问题, 并阐述了模拟自然环境条件、强调微生物相互关系是提高微生物可培养性的关键。

关键词: 微生物可培养性 纯培养技术 群体感应

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)03-0504-04

长期以来, 人们利用纯培养技术对环境中的微生物进行调查研究和开发利用。但是, 研究表明自然界中绝大多数微生物尚不能被目前的纯培养技术所培养, 这些微生物称为不可培养微生物(unculturable/uncultivable microorganism)^[1,2]。随着研究的深入, 不可培养微生物占人类已知微生物种类的比例越来越大, 例如, 在 1987 年发现的微生物有 26 个类群(phylo)均可培养, 而今已发现的微生物类群达到了 52 个, 其中近半数不可培养^[3]。为了更准确、广泛地研究环境中的微生物, 随后不采用培养手段, 而利用分子生物学技术和手段, 例如宏基因组学(Metagenomics)的方法来获取不可培养微生物的基因资源。这类方法的应用极大地推动对自然界中微生物功能资源的开发和应用, 但是仍然没有克服微生物不可培养所导致的根本弊端。因为, 这些方法不以获取微生物活体细胞为目的, 致使无法准确了解微生物细胞的生命活动以及微生物群落中各种微生物相互协调的规律, 进而无法对环境微生物工艺进行准确地设计、精细地调控和高效地利用。因此, 在利用分子生物学技术手段研究微生物和微生物群落, 开发微生物基因资源的同时, 需要大力开发微生物培养技术, 以提高微生物可培养性, 尽可能培养不可培养微生物。

1 微生物不可培养的原因

对微生物进行常规培养时, 由于生活条件的改变, 有些微生物不能适应而死亡, 另一些则通过产生孢子进入休眠状态或改变细胞形态, 进入维持一定代谢活性但不生长繁殖的“活的非可培养状态”(Viable but nonculturable state, VBNC)^[4], 结果均表现为微生物的“不可培养性”。实际上, 微生物的不可培养性是由于对微生物生长条件及其规律性的认识严重不足, 而采取了偏离微生物生长实际情况的培养条件所造成的, 这些偏离具体可以包括以下几个方面。

1.1 采用高浓度的营养基质

最初对微生物的培养是在富含营养的培养基中进行的, 但是由于自然界中微生物数量庞大, 其可利用的营养物质极

度匮乏, 多数处于“贫营养”状态。常规纯培养对这种认识不充分, 通常将寡营养微生物迅速置于富营养状态, 微生物初期的快速生长会产生大量的、微生物自身难以调节的过氧化氢、超氧化物和羟基自由基等“毒性氧物质”(Reactive oxygen species)^[5], 该类物质快速、过量的积累会破坏细胞内膜结构^[6], 导致细胞死亡, 从而表现出微生物的不可培养性。

1.2 实验室中无法完全模拟自然环境条件

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了解尚不充分。因此, 人们没有或无法完全模拟微生物的自然生存条件, 而通常将培养条件进行简化: 将微生物置于恒温、恒湿、黑暗等环境中; 将微生物限制在“板结”的琼脂或不扰动的液体介质中; 简化微生物的营养组成没有提供微生物生长繁殖所必需的某些化学物质, 等等。所以在自然界中可以生长繁殖的微生物, 在“纯培养”中生长条件得不到满足, 从而导致了微生物的不可培养性。

1.3 环境微生物之间的相互关系被忽略

微生物相互关系繁多复杂, 包括(1)种间的偏利共生关系(Commensalism)和互惠共生关系(Mutualism), 两者的共性是至少一个群体提供另一些群体所需的生长因子而使微生物群体获利;(2)群体感应(Quorum sensing), 这种关系被认为是通过细菌间的信息交流来调控细菌的群体行为^[7]; 细胞通过感应一种胞外低分子量的信号分子来判断菌群密度和周围环境的变化, 从而调节相应的细菌表达以调节细菌的群体行为^[8]。以上这两种关系都是微生物生长所必需的。由于人们目前对环境中微生物之间多数复杂的相互关系所知甚少, 采用的培养技术没有将这种关系考虑在内, 纯培养技术将待培养的微生物与其它微生物群体、以及生存环境人为地分离开, 种间的共生关系和信息交流被阻断, 微生物缺乏必需的生长因子和信号分子而死亡, 表现出微生物的不可培养性。

1.4 生长缓慢的微生物被忽视

环境中很多微生物都聚集生长, 当将这些微生物接种至培养基时, 适合生长的微生物由于生长快而占据优势地位, 它们对营养成分的大量摄取使生长缓慢的微生物得不到充

基金项目: 国家 973 项目(2005CB221308) 国家自然科学基金(30300008)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62772137; Fax: 86-10-62771472; E-mail: xiaolei_wu@tsinghua.edu.cn

作者简介: 郭 斌(1983-)男, 天津市人, 硕士研究生, 研究方向为海洋微生物群落结构和资源。E-mail: guo-b@mails.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2005-07-28; 接受日期: 2005-09-12; 修回日期: 2005-11-05

足营养而生长受到抑制。

此外,对微生物生长状况进行判断的常规标准存在的缺陷,也导致某些微生物生长不被发觉,表现为“不可培养”。例如,生存于贫营养环境中的微生物尽管能够在低浓度营养条件下生长,但是有些微生物生长速度极为缓慢,在常规设定的培养周期内(例如1周)没有长成肉眼可见的菌落就被遗弃。除此之外,还有一些寡营养微生物不会形成菌落,而是在固体培养基表面迁徙生长(Swarming growth)和扩散生长(Dispersion),它们形成只能显微可见的几个细胞组成的小型集合^[9]。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“不可培养性”。

总之,导致微生物不可培养的因素有多种,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。克服这些制约因素,就可以较好地提高微生物的可培养性。目前,提高微生物可培养性的方式可分为两大类,即改进培养措施和开发新型培养技术。

2 改进微生物培养措施

2.1 减少毒性氧物质的毒害作用

由于常规培养方法使用的高浓度营养基质不利于微生物生长,适当降低营养基质的浓度可以减弱这种不利影响。Agoff^[10]发现低浓度基质的培养基培养出的细菌在数量和种类上均多于高浓度基质的培养基,但营养浓度过低时会使培养出的微生物数量反而下降^[11]。实际上,营养基质浓度最好与微生物自然生长环境相近,例如,辅以少量生长因子的天然海水,或土壤浸提液作为培养基可以很好地培养海洋微生物和土壤微生物^[12]。另外,多聚物只有被水解为小分子物质时才能被微生物利用。以多聚物为碳源,能有效减缓毒性氧释放的速度,避免微生物在短时间内受到高强度的毒性作用^[13]。同时,充足的氧气有时也是毒性氧产生的原因之一,减少培养环境中的氧分压可减弱毒性氧的影响^[14]。以上3种措施均可减少微生物代谢过程产生的毒性氧,但有些情况下,毒性氧来源于微生物生命活动以外的过程,例如高压灭菌^[13]。

为了减少各种过程产生的毒性氧,可在培养过程中加入具有毒性氧降解能力的物质,例如过氧化氢酶、丙酮酸钠和 α -酮戊二酸等过氧化氢降解剂和抗氧化剂二硫代二丙酸^[15]。已经证实这些物质可使某些处于VBNC状态的细菌的可培养性得到不同程度的恢复^[15-18]。其中丙酮酸钠对微生物可培养性恢复的效果最好^[19],且具有稳定、成本低等优点。

2.2 维持微生物间的相互作用

在培养基中加入微生物相互作用的信号分子就可简单模拟微生物间的相互作用,满足微生物生长繁殖的要求,例如加入酰基碳链长度各异的氮酰高丝氨酸内酯均能有效提高细菌的可培养性^[11,14],而与革兰氏阴性菌多种基因调控有关的另一种信号分子cAMP比氮酰高丝氨酸内酯能够促使更多细菌得到培养^[20,21]。Mukamolova等^[22]在研究藤黄微球菌时发现它分泌一种促进复活因子(Resuscitation promoting factor, Rpf),可有效促进多种处于休眠期的革兰氏阳性菌复苏。同源性分析结果表明Rpf存在于多种革兰氏阳性菌中,推测原核生物可能广泛存在于该类物质,因此,可考虑加入不同类型的Rpf来提高环境中微生物可培养性^[23]。

2.3 其他改进措施

2.3.1 供应新型的电子供体和受体 不同微生物的代谢过程不同,因此对反应的底物要求也不尽相同。供应微生物需要的特有底物有助于新陈代谢反应的进行及微生物的正常生长。大量的研究表明,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^[24,25]。

2.3.2 分散微生物细胞 自然界中很多微生物聚集生长,形成“絮体(floc)”和“颗粒(aggregate)”等,致使其内部的微生物不易被培养。对“絮体”和“颗粒”进行适度的超声处理,将细胞分散再进行培养,可以使更多的微生物接触培养基而得到培养^[26]。

2.3.3 延长培养时间 对“寡营养菌”的培养,可适当延长培养时间,使其能长至肉眼可见的尺度^[14,27,28]。当然培养时间不能无限增长,因为培养时间越长,对培养环境的无菌要求就越高^[13]。

2.3.4 利用琼脂替代物 琼脂对某些微生物具有毒性作用,采用无害且凝结作用较好的替代物质(例如古兰糖胶)作为培养基固化剂,可以增加微生物的可培养性^[26]。

3 开发新型培养技术

3.1 稀释培养法和高通量培养法

在地球环境中,海洋环境中迄今可培养微生物的比例最低,仅为0.001%~0.1%^[29],这是由于海洋环境中主要是寡营养微生物,它们在人工培养时往往受到少数优势生长的微生物的竞争作用而不能生长。为了克服该缺陷,1993年Button^[30]从概率论的角度提出一个崭新的方法,即稀释培养法(Dilution culture)。该方法认为,当把海水中微生物群体稀释至痕量时,在海水中主要存在的寡营养微生物可以不受少数几种优势微生物的竞争作用的干扰,因而主体寡营养微生物被培养的可能性会大大提高。随后,Schuf^[31]等的实际操作验证了该理论的正确性。

2002年Connor^[32]在稀释培养法的基础上提出高通量培养法(High-throughput culturing, HTC)。将样品稀释至痕量后,采用小体积48孔细胞培养板分离培养微生物。该方法不仅有效提高微生物的可培养性,还可在短期内监测大量的培养物,大大提高工作效率。Cho^[33]等利用该方法从太平洋近海和远洋海水中也分离出多种新菌。Rappé和Connor^[34]结合荧光原位杂交技术(FISH),对高通量培养法进行了改进,根据从培养板各孔中针对性地检测SAR11进化分支的海洋细菌的存在,在较短时间内对目标微生物进行了大量的培养。

但是,稀释培养法和高通量培养法成功的原因恰恰又是制约其进一步发展的障碍。在样品稀释、微生物间的不利作用被削弱的同时,有利作用也被削弱。例如,当微生物被极度稀释,初始接种量很小时,一些微生物分泌的代谢产物也被稀释,其他关联微生物细胞由于缺乏这些必须的代谢产物,生长就会受到抑制^[35];另外,缺少种间的共生关系和群体效应,很多微生物仍然不可培养。

3.2 扩散盒培养法

Kaerberlein^[2]等在分离培养潮间带底泥中的微生物时使用一种新颖的自制培养仪器,为其起名为扩散盒(Diffusion growth chamber)^[36]。扩散盒由一个环状的不锈钢垫圈和两侧胶连的0.1 μ m滤膜组成,滤膜只能允许培养环境中的化学物质通过而不能让细胞通过。将底泥样品置于扩散盒内的半固体培养基中,扩散盒置于鱼缸底部的天然海洋底泥上,往鱼缸内加入天然海水并保证扩散盒内存有一定空气供微生物生长。培养时,使天然海水循环流动,并不断注入新鲜的海水。培养1周后培养基上产生大量的微型菌落,数目高达接种微生物的40%。这种培养方法能较大幅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,可保证微生物群落间相互作用的存在,提高微生物可培养性。扩散盒法的主要不足是操作比较繁琐。

3.3 细胞包裹法

Zengler等^[12]将海水和土壤样品中的微生物先进行类似稀释培养法的稀释过程,然后乳化,部分微生物形成了仅含

单个细胞的胶状微滴。然后将胶状微滴装入层析柱内,使培养液连续通过层析柱进行流态培养。层析柱进口端用 $0.1\mu\text{m}$ 滤膜封住,防止细菌的进入而污染层析柱;出口端用 $8\mu\text{m}$ 滤膜封住,允许培养产生的细胞随培养液流出。该方法的特点是让微生物在开放式培养液中生长,使培养环境接近于微生物的自然生长环境,能够很好地提高微生物可培养性,但成本较高,不利于普及使用。

3.4 序列引导分离技术

序列引导分离技术(Sequence-guiding isolation)是根据微生物基因组中特定基因的特异性序列,设计引物或杂交探针,以培养物中目标序列存在和变化情况为标准,来指导对微生物最优培养条件的选择,培养出新的微生物。

Stevenson^[14]在细菌培养过程中采用了多种培养条件的组合,导致培养方案繁多复杂。为了减少分离细菌的工作量、节省时间,用 PCR 作为监测手段来确定目标细菌是否得到培养。当细菌在固体培养基上长出菌落后,用缓冲液冲洗培养基表面,提取冲洗液中细菌的 DNA,根据目标细菌的 16S rDNA 扩增情况判断目标细菌的存在与否。继续用 PCR 方法监测目标细菌直至分离得到纯菌株。Beja 等^[37]通过对尚未培养的海洋变形细菌的 BAC 基因文库进行研究,发现该类菌具有编码视紫红质的基因片段。视紫红质是光营养过程中不可或缺的化学物质。据此设想增加光照可提高该菌的可培养性,而进一步的实验结果验证了该假设的正确性。此外, Breznak^[38]指出,分子原位杂交技术可以对推断目标微生物的代谢方式和营养需求提供帮助,极大地节省工作时间,操作也很简便,仅需要一种特异性的探针,显示了在微生物培养时引入分子生物学技术作为引导的优势和力量。

4 问题和展望

目前通过可培养微生物的总体数量来判断微生物可培养性,进而评价微生物培养方法的优劣。然而,这项评价指标没有考虑可培养微生物的群落结构。实际上,表征微生物可培养性不仅仅要根据可培养微生物的总体数量,还要分析可培养微生物的群落结构,即可培养微生物的种类丰富度和均匀度,微生物可培养性指标应该是这 3 种因子的函数,即:

$$C = f(P, R, E)$$

其中: C —微生物的可培养性(Culturability),反映可培养微生物的种类和数量占实际微生物总种类和数量的比例;

P —可培养微生物的细胞数(CFU/L),即传统可培养性的涵义;

R —可培养微生物的种类丰富度(species richness),即可培养微生物的种类数目;

E —可培养微生物的种类均匀度(species evenness)。

$$E = \frac{H}{H_{\max}} = \frac{-\sum_{i=1}^R P_i \log P_i}{\log R}$$

其中: H —香农-韦纳指数;

P_i —一种 i 的个体在可培养微生物全部个体中的数量比例。

该公式中,各因素的重要性为 $R > P > E$,即可培养微生物的种类丰富度重要性最高。

在以上论述的各种方法中,模拟自然环境条件,维持微生物种群间的相互关系是提高环境中微生物可培养性的关键。因此,提高微生物可培养性方法的研究应该主要围绕在这一方面,进行深入改进和发展,例如,可考虑将环境微生物用环境介质混合培养至生长稳定阶段,然后将菌液离心过滤,用上清液作为培养基培养微生物^[39],或者借鉴

Kaerberlein^[2]采用的扩散盒培养法,这些方法由于在培养过程中引入了多种微生物自然分泌的信号分子和促进复活因子,均可较好地强化微生物之间的相互关系,而克服引入单一信号分子的效果有限且操作费时费力的缺点。此外,在培养过程中结合多种培养因素、组合采取多种培养方案来取代模拟一种培养条件的方案,可以获得更多可培养的微生物、取得更高效的培养结果^[21,40]。

总之,由于微生物群落及其生存环境的复杂性,在任何情况下试图提高微生物的可培养性都不能仅局限于一种或几种方法,而应综合采用多种有效的方法。另一方面,还应在发展微生物培养技术同时,结合分子生物学技术,使两种方法相辅相成,更好地提高微生物的可培养性。

参考文献

- [1] Newman DK, Banfield JF. Geomicrobiology: How molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. *Science*, 2002, **296**: 1071-1077.
- [2] Kaerberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 2002, **296**: 1127-1129.
- [3] Rappé MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol*, 2003, **57**: 309-394.
- [4] 岳秀娟, 余利岩, 张月琴. 自然界中处于 VBNC 状态微生物的研究进展. *微生物学通报* 2004 **31**(2): 108-111.
- [5] Bloomfield SF, Stewart GS, Dodd CE, et al. The viable but nonculturable phenomenon explained? *Microbiology*, 1998, **144**: 1-3.
- [6] Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Biology of Microorganisms (The Nine Edition)*. New Jersey: Prentice-Hall, 2002, 158-161.
- [7] 付艳芳, 唐李斐, 万军庭, 等. 细菌的信息交流. *氨基酸和生物资源* 2004 **26**(4): 62-64.
- [8] 周玥, 刘小锦, 朱晨光, 等. 细菌中群体感应调节系统. *微生物学报* 2004 **44**(1): 122-126.
- [9] Simu K, Hagström A. Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 2445-2451.
- [10] Aagot N, Nybroe O, Nielsen P, et al. An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 5233-5239.
- [11] Bussmann I, Philipp B, Schink B. Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. *J Microbiol Methods*, 2001, **47**: 41-50.
- [12] Zengler K, Toledo G, Rappé MS, et al. Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **26**: 15681-15686.
- [13] Sait M, Hugenholtz P, Janssen PH. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ Microbiol*, 2002, **4**: 654-666.
- [14] Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, et al. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 4748-4755.
- [15] Mizunoe Y, Wai SN, Takade A, et al. Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H_2O_2 -degrading compounds. *Arch Microbiol*, 1999, **172**: 63-67.
- [16] Mizunoe Y, Wai SN, Ishikawa T, et al. Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **186**: 115-120.

- [17] Wai SN, Mizunoe Y, Takade A, *et al.* A comparison of solid and liquid media for resuscitation of starvation- and low-temperature-induced nonculturable cells of *Aeromonas hydrophila*. *Arch Microbiol*, 2000, **173**: 307 – 310.
- [18] Bogosian G, Aardema ND, Bourneuf EV, *et al.* Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state. *J Bacteriol*, 2000, **182**: 5070 – 5075.
- [19] Olson JB, Lord CC, McCarthy PJ. Improved recoverability of microbial colonies from marine sponge samples. *Microb Ecol*, 2000, **40**: 139 – 147.
- [20] Bruns A, Cypionka H, Overmann J. 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.
- [21] Bruns A, Nübel U, Cypionka C, *et al.* Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**: 1980 – 1989.
- [22] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, *et al.* A bacterial cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 8916 – 8921.
- [23] 苏明权, 李立文, 张彩莲, 等. 结核分枝杆菌 Rv1009 的生物信息学分析及克隆、表达. *生物技术通讯*, 2003, **14**(6): 557 – 559.
- [24] 焦瑞身. 新世纪微生物学者的一项重要任务——未培养微生物的分离培养. *生物工程学报* 2004, **20**(5): 641 – 645.
- [25] Leadbetter JR. Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr Opin Microbiol*, 2003, **6**: 274 – 281.
- [26] Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, *et al.* Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 2391 – 2396.
- [27] Mitsui H, Gorlach K, Lee HJ, *et al.* Incubation time and media requirements of culturable bacteria from different phylogenetic groups. *J Microbiol Methods*, 1997, **30**: 103 – 110.
- [28] Joseph SJ, Hugenholz PP, Sangwan PC, *et al.* Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 7210 – 7215.
- [29] 叶姜渝, 罗国源. 未培养微生物的研究与微生物分子生态学的发展. *微生物学通报* 2004, **31**(5): 111 – 115.
- [30] Button DK, Schut F, Quang P, *et al.* Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 881 – 891.
- [31] Schut F, Vries EJ, Gottschal JC, *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.
- [32] Cannon SA, Giovannoni SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 3878 – 3885.
- [33] Cho JC, Giovannoni SJ. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 432 – 440.
- [34] Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, *et al.* Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, 2002, **418**: 630 – 633.
- [35] 池振明编著. 微生物生态学. 济南: 山东大学出版社, 1999: 56 – 57.
- [36] Diffusion growth chamber, www.sciencemag.org/cgi/content/full/296/5570/1127/DC1
- [37] Bèjà O, Aravind L, Koonin EV, *et al.* Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, 2000, **289**: 1902 – 1906.
- [38] Breznak JA. A need to retrieve the not-yet-cultured majority. *Environ Microbiol*, 2002, **4**: 4 – 5.
- [39] Votyakova TV, Kaprelyants AS, Kell DB. Influence of viable cells on the resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase: the population effect. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **64**: 3284 – 3291.
- [40] Zinder SH. The future for culturing environmental organisms: a golden era ahead? *Environ Microbiol*, 2002, **4**: 14 – 15.

Approaches for increasing the culturability of microorganisms

GUO Bin, WU Xiao-lei*, QIAN Yi

(Environmental Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Only a tiny amount of microorganisms on the earth can be cultured so far, which seriously obstructs the investigation into principles of microbial activities and exploiting microbial resources. To improve the culturing methods and to develop novel culturing techniques is therefore very important to increase the culturability of microorganisms and to isolate more uncultured microorganisms, which is of crucial importance to research principles of microbial life, to understand the interaction between microbial cells for correctly designing, applying and manipulating environmental microbial processes. This review systematically summarized the causes for microorganisms' unculturability and recent work on the approaches to increase the culturability of microorganisms. To mimic natural environment (physically, chemically and biologically) and to introduce microbial interactions into culture medium as many as possible is suggested to be of key importance to increase culturability of microorganisms.

Keywords: Culturability of microorganisms; Pure culturing methods; Quorum sensing