

# 基于聚合物膜包封的微生物原位培养装置

金呈辉<sup>1,2#</sup>, 何冰欢<sup>1#</sup>, 赵丽茹<sup>1,2</sup>, 张保健<sup>1,2</sup>, 李备<sup>1,2,3\*</sup>

1 温州医科大学 眼视光学院, 浙江 温州

2 长春长光辰英生物科学仪器有限公司, 吉林 长春

3 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 光学系统先进制造技术重点实验室, 吉林 长春

金呈辉, 何冰欢, 赵丽茹, 张保健, 李备. 基于聚合物膜包封的微生物原位培养装置[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 3007-3022.

JIN Chenghui, HE Binghuan, ZHAO Liru, ZHANG Baojian, LI Bei. An *in-situ* culture device for microorganisms based on polymer membrane encapsulation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(7): 3007-3022.

**摘要:** 【目的】传统培养方法仅能揭示微生物多样性的一小部分, 大量微生物无法在实验室条件下培养。原位培养技术的出现为解决这一问题提供了关键手段, 本研究旨在创新原位培养技术, 研究未知培养条件下的微生物, 并探究其在未培养微生物领域的潜在应用。【方法】采用PCR管作为装置主体, 引入“先分选, 再培养”的概念, 通过聚合物膜分隔微生物与环境进行独立培养。通过大肠杆菌纯培养实验验证了装置的有效性, 并将其应用于土壤、污水和山泉水等不同环境的原位培养中。【结果】验证实验结果显示, 大肠杆菌纯培养装置内大肠杆菌的丰度显著增加。在聚合物膜浓度达到15%时, 包封效果即可有效防止大肠杆菌逃逸, 共培养实验进一步验证了这一结论。在原位培养实验中, 成功应用所设计的装置从污水、土壤和山泉水样本中培养了单细胞微生物。测序结果表明, 该方法可以培养在实验室中难以培养的物种。通过比对NCBI数据库, 确认成功培养出了新的物种, 证明了培养装置在不同环境下的有效性。【结论】本研究的培养方法适用于单细胞微生物培养、特定微生物群落富集和多种微生物共培养。相比传统培养方法, 该技术能分离并培养更多的微生物种类和数量。新技术不仅分离和培养出了更多微生物, 还培养了之前无法在实验室条件下培养的微生物, 对微生物学和生态学研究具有重要意义。

**关键词:** 微生物暗物质; 原位培养; “先分选, 再培养”; 未培养微生物; 聚合物膜

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: beili@ciomp.ac.cn

Received: 2024-12-20; Accepted: 2025-02-11; Published online: 2025-04-15

# An *in-situ* culture device for microorganisms based on polymer membrane encapsulation

JIN Chenghui<sup>1,2#</sup>, HE Binghuan<sup>1#</sup>, ZHAO Liru<sup>1,2</sup>, ZHANG Baojian<sup>1,2</sup>, LI Bei<sup>1,2,3\*</sup>

1 School of Ophthalmology and Optometry, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang, China

2 Hooke Instrument Co., Ltd., Changchun, Jilin, China

3 State Key Laboratory of Optics System Advanced Manufacturing Technology, Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin, China

**Abstract:** [Objective] Conventional culture methods can merely uncover a fraction of microbial diversity. A vast number of microorganisms remain unculturable under laboratory settings. The advent of *in-situ* culture technology offers a key solution to this predicament. This study endeavors to innovate the *in-situ* culture technology, explore microorganisms under hitherto unknown culture conditions, and probe into their potential applications within the realm of uncultured microorganisms. [Methods] PCR tubes were employed as the core of the device, and the idea of sorting prior to culture was introduced. Microorganisms were separated from the environment by means of polymer membranes for independent culture. The efficacy of the device was validated through the pure culture of *Escherichia coli*. Moreover, this device was applied to *in-situ* culture in diverse environments such as soil, sewage, and mountain spring water. [Results] The abundance of *E. coli* increased significantly in the pure-culture device. When the concentration of the polymer membrane reached 15%, the encapsulation effect effectively prevented the escape of *E. coli*. The co-culture experiments further corroborated this finding. In the *in-situ* culture experiments, the device designed in this study successfully cultured single-cell microorganisms from sewage, soil, and mountain spring water samples. Sequencing results indicated that this device could culture species recalcitrant to be cultured in the laboratory. Comparison with the NCBI database verified that new species were successfully cultured, which demonstrated the effectiveness of the culture device in various environments. [Conclusion] The culture method designed in this study is suitable for single-cell microbial culture, enrichment of specific microbial communities, and co-culture of multiple microorganisms. The device can isolate and culture richer and more microorganisms than conventional culture methods. This new technology not only isolates and cultures more microorganisms but also manages to culture those previously unculturable under laboratory conditions. It holds great significance for microbiological and ecological research.

**Keywords:** microbial dark matter; *in-situ* culture; sorting prior to culture; uncultured microorganisms; polymer membrane

在微生物多样性这一宏大画卷中，传统培养方法仅能够展现极为微小的一部分<sup>[1-2]</sup>。微生物学和生态学的发展依赖于对微生物多样性的理解与探索<sup>[3-5]</sup>。原位培养技术的出现，源于对

微生物学和生态学的不断探索和认识<sup>[6]</sup>。一直以来，在实验室中的人工培养细胞方法成为研究微生物的主要手段，这使得科研人员能够在受控环境中对快速增殖的微生物进行细致的研

究<sup>[7]</sup>。尽管这种方法取得了不错的科研成果,但随着“大平板计数异常”(the great plate count anomaly)问题的出现<sup>[8]</sup>,科学家们逐渐认识到,只有很少一部分微生物可以在实验室中成功培养,绝大多数微生物无法在人工培养条件下生存和繁殖<sup>[1-2,9]</sup>。这一问题引起了大量科研人员对所谓“微生物暗物质”(microbial dark matter)的广泛关注和研究<sup>[10-12]</sup>。

近年来,随着对未培养微生物领域的持续探索,研究人员们在生物化学和分子生物学领域取得了许多突破性进展<sup>[10,13-16]</sup>。通过使用细菌 16S rRNA 基因库构建、DNA 芯片技术、荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、高通量测序和宏基因组学等方法他们发现了许多之前未发现的微生物物种<sup>[17-19]</sup>。然而,这些分析技术的进步并不能完全解决未培养微生物带来的问题。由于对许多基因功能的理解仍不明确,人们难以准确了解微生物的代谢机制,因此目标微生物的可培养性缺少足够的信息,分子生物学方法限制了种群水平上微生物形态、代谢以及与环境相互作用的研究<sup>[20]</sup>。因此,原位培养技术的出现便成为了解决这一问题的关键手段<sup>[21-24]</sup>。原位培养是指在微生物生长的自然环境中直接培养微生物,其实质是将自然环境中的复杂性引入实验设计中,从而更好地模拟其原始生长环境。它能使研究人员接触和研究那些平时无法在实验室培养的物种,并促进它们在更接近自然状态下的生长<sup>[25]</sup>。这项技术尝试捕获并驯化那些难以在实验室条件下培养的微生物。填补了关于“微生物暗物质”的知识空白<sup>[11-12]</sup>。通过这种方法,微生物学家可以直接在野外或原始环境中培养微生物,或者在野外收集样本后,在实验室中进行接近原位条件的培养<sup>[26-28]</sup>。随着现代分子生物学技术和基因测序技术的持续发展,原位培养已经逐渐成为微生物学和生态学研究中的一种重要手段,为微生物学家更深入地了解地球上微生物世界的奥秘提供了强有力的工具。通过原位培养,

研究人员可以发现许多以前未知的微生物种类,挖掘它们在生态系统中的功能,以及寻找具有潜在应用价值的微生物产物,从而推动科学研究和实际应用的进步<sup>[29]</sup>。

本研究描述了一种在新型原位培养装置中采用“先分选,再培养”这一概念选择性培养未知培养条件微生物的方法。通过激光诱导前向转移 (laser-induced forward transfer, LIFT) 单细胞分选技术将经过标记的待培养微生物从环境样品中分离出来,并使用固化聚醚砜/N,N-二甲基甲酰胺 (N,N-dimethylformamide, DMF) 溶液方法将其封装入多个 PCR 管或八联排中,最后将封装完成的培养装置返回自然环境或实验室模拟环境进行培养。此方法可以对未知培养条件的微生物进行选择培养,并且能够在保证一定通量的同时确保每一个原位培养腔室内的微生物不会通过腔室之间的空隙相互污染。“先分选,再培养”这一概念不仅提高了未知培养条件微生物的培养成功率,还能对特定微生物类型进行深入研究,尤其适用于那些难以在标准实验室条件下培养的未培养微生物。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 原位培养装置设计

本研究设计原位培养结构主要由 2 部分构成:聚醚砜/DMF 溶液固化形成的聚合物膜和充满细胞悬液的 PCR 管。首先,PCR 管具备足够的容积,可以容纳满足微生物生存和生长的液体环境,确保微生物在生长过程中不会因脱水而死亡;并且由于浓度过高的 DMF 可能对微生物生长产生抑制作用,因此充足的液体环境可以对包封时的 DMF 进行稀释,并将其对微生物生长及繁殖的影响降至最低。其次,使用多个 PCR 管同时培养或用八联排培养可以确保每个 PCR 管相互独立,这不仅防止了管与管之间的微生物发生交叉污染,而且保证了实验的通量与独立性。最后,聚醚砜/DMF 溶液凝固形成

的聚合物膜用于分隔 PCR 管内的微生物和自然环境。这种聚合物膜所具有的微小通孔能够在让小分子营养物质和代谢废物自由通过的同时阻止膜内外的细胞迁移，维持每个培养槽内微生物的独立性。通过这种设计，既保证了微生物的独立培养，又提供了必要的营养物质交换和废物排除通道，从而确保了实验的精确性和可靠性。完整实验操作流程如图 1 所示。

## 1.2 环境样品的收集

在选择环境样品时，需要考虑样品的特性和来源，并选择相应的方法进行采样。在采集样品时，使用无菌手套、无菌镊子等隔离工具，以尽可能减少外部污染及降低人为因素造成的影响，并尽量选择远离污染源的区域，以确保样品的原始性。本研究的水体样本取自中国长春长白山的山泉水，GPS 位置为 42.154 0°N、128.122 0°E，海拔约为 1 875 m，温度约 4 °C。用 50 mL 的无菌试管对泉水下方的水池处进行采样。另外，从水池上方流动的泉水处接水作为对比，取样过程中尽量减少人为接触造成的

污染，并对取样完成的泉水尽快置于 4 °C 的低温保存。土壤样本取自中国吉林省长春市，GPS 位置为 43.515 0°N、125.234 7°E，在室温下装入无菌离心管内保存。污水样本取自生物实验室的生物污水。这 3 种环境样本对应 3 种不同的培养条件，其中实验室废水对应液体环境培养，土壤对应陆地环境培养，长白山山泉水对应低温环境培养。收集完成后记录样品的来源、采集时间、地点以及相关环境因素(如温度、湿度、pH 值)等相关数据以便后续将原位培养结构返回原位环境培养。

## 1.3 聚醚砜/DMF 溶液的制备及不同浓度对封装效果的验证

为了深入研究不同浓度聚醚砜/DMF 溶液对实验结果的影响，本研究将固态的聚醚砜颗粒完全溶解于 N,N-二甲基甲酰胺溶剂中，制备出浓度为 10%、12.5%、15%、20%、25% 的聚醚砜/DMF 溶液。通过对比不同浓度溶液包封微生物后的培养结果来评估包封的密闭性及对营养物质渗透性的影响。在对封装效果的验证过程

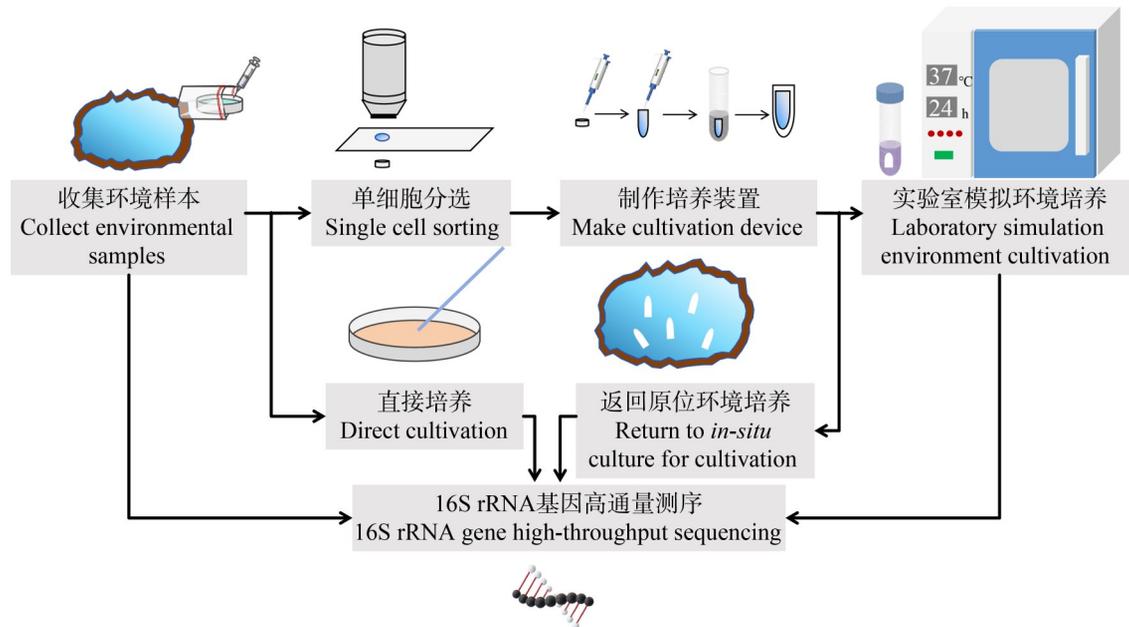


图1 完整实验操作流程

Figure 1 Complete experimental operation flowchart.

中, 本研究将大肠杆菌包封后置入无菌的 LB 液体培养基, 并在实验室条件下进行培养, 通过检测大肠杆菌最终浓度来评估包封效果。具体实验流程如图 2 所示。

#### 1.4 环境样品预处理

环境样品预处理是确保后续实验中样品内微生物状态符合实验要求的关键步骤。在样品保存阶段, 需要根据所采集环境样品的特性和来源, 采取相应的保存措施以避免因温度变化或长时间暴露在外界环境中导致微生物的死亡或性状改变, 如本研究收集的长白山山泉水样本需要保存在 4 °C 的低温环境中。样品在运输至实验室途中若发生分层或沉淀现象, 则需要在使用前对样品进行充分混匀, 以确保样品中的微生物分布均匀。对于固体样品(如土壤样品等)的处理, 可以先在样品内加入 PBS 制成悬浮液, 再使用梯度离心法: (1) 1 000 r/min 离心 5 min, 取上清液; (2) 2 000 r/min 离心 5 min, 取上清液; (3) 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液; (4) 8 000 r/min 离心 5 min, 取沉淀。离心完成后, 清洗样本以除去样品中的杂质, 从而提高样品的可操作性。在处理含有大量杂质的液体样品(如实验室污水等)时, 需要先对样品进行过滤、沉淀、离心或去除有机物等操作, 以此去除样品中的大颗粒物质及其他影响后续实验

的杂质, 便于后续实验的顺利进行。在去除杂质后, 需根据样品浓度进行适当稀释, 确保样本中微生物浓度符合实验要求, 同时避免浓度过高对后续分选、培养和分析等步骤产生不利影响。完成前期预处理操作后, 可以额外使用标记手段<sup>[30]</sup>在经过预处理的环境样品中标记想要分选的特定细胞种类, 以便进行后续的分选操作。在预处理过程中, 应尽可能缩短处理时间, 避免处理时间过长导致样品中微生物的死亡或性状改变。

#### 1.5 单细胞分选

为了确保所培养微生物的单一性, 本研究使用激光诱导前转移 (laser-induced forward transfer, LIFT) 技术<sup>[31-32]</sup>对环境样本进行单细胞分选, 此技术利用显微镜定位微生物后使用激光脉冲照射到芯片涂层表面, 涂层吸收激光能量并蒸发, 下方的微生物被涂层蒸发后产生的推力弹射至接收器内。首先, 使用分光光度法对处理后的样品浓度进行测定, 根据测定结果计算稀释次数, 使用连续稀释法将样品浓度稀释至约  $10^4$  CFU/mL。随后, 准备多个经过灭菌处理的接收器(PCR 管盖或单独定做), 为了确保后续实验的顺利进行, 接收器的数量应略多于计划制作的培养装置, 以应对分选效果不佳导致的接收器报废风险, 每个接收器内事先用移液

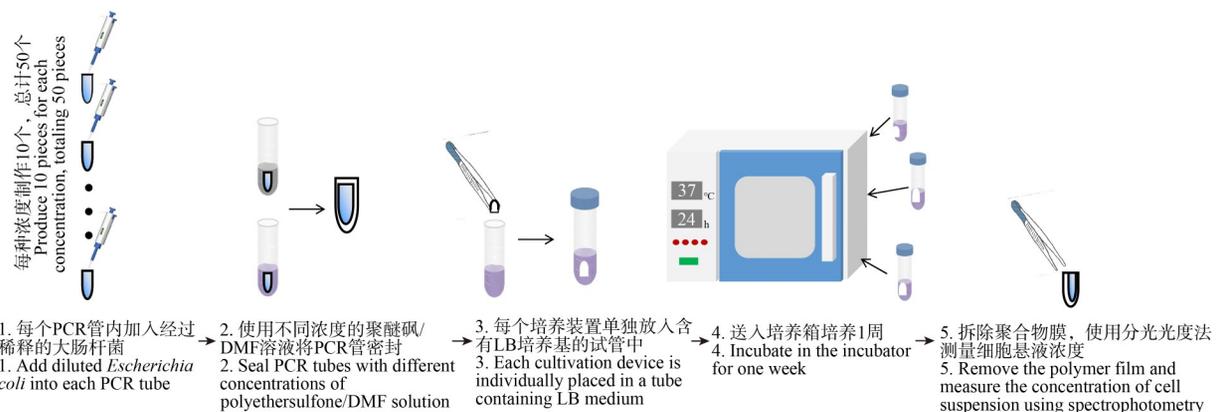


图2 封装验证实验流程图

Figure 2 Encapsulation verification experiment flowchart.

枪注入 40  $\mu\text{L}$  的 PBS 溶液备用, 将所有接收器通过无菌培养皿转移至单细胞分选仪的超净台等待下一步操作。

在单细胞分选仪的超净台中, 用移液枪取 10  $\mu\text{L}$  样品滴至经过亲水处理的 LIFT 分选芯片上, 确保液滴能够在芯片上平摊开, 这样便于在显微镜下进行成像观察。在单细胞分选仪的显微镜下, 定位到经过标记的单个微生物, 通过精确控制激光器的强度, 实现激光对微生物的精确捕获, 并将其安全弹射至接收器中, 而不对细胞造成损伤。

### 1.6 聚合物膜包封培养装置

将成功接收到单细胞的接收器转移至层流台内进行下一步操作。首先, 根据制作的培养装置数量准备若干个经过高温灭菌处理的 PCR 管, 并在每个 PCR 管内加入 100  $\mu\text{L}$  的 PBS 溶液。接下来, 将各个接收器中的细胞悬液分别转移至所有 PCR 管内。最后, 为了确保每一个 PCR 管内只有一个细胞, 并且管内细胞能够接触到封装完成后由原位环境中渗入的营养物质, 需要用 PBS 溶液将所有 PCR 管填满。由于封装的聚合物膜含有微小通孔, 允许环境中的氧气等营养物质进入, 因此填满后的培养装置并不会对待培养微生物产生影响, 同时也为后续的培养装置封装步骤做准备。

为了防止在密封过程中 PCR 管内的细胞悬液外泄, 影响实验结果的准确性, 本研究在培养装置整体密封之前, 对 PCR 管进行初步的封口处理, 即在 PCR 管的管口处加入适量的聚醚砜/DMF 溶液, 静置数秒, 让溶液与管内 PBS 溶液充分结合并固化完成封口。封口完成后使用无菌水将多余的 DMF 彻底冲洗干净。随后, 用镊子将所有封口后的 PCR 管分别浸入聚醚砜/DMF 溶液中 20–30 s, 使管表面形成一层透明未凝固的聚合物膜。最后, 将 PCR 管转移到无菌水中进行浸泡冲洗, 以实现聚合物膜涂层的整体包裹固化, 并去除表面残留的 DMF。此步骤可多次重复, 以确保聚合物膜包封效果良好。

### 1.7 培养装置回归原位环境及其回收

根据采集样品时记录的样品来源、采集时间、地点以及相关环境因素(如温度、湿度、pH 值等)将制备好的原位培养装置送回原位环境中或放入模拟记录条件的实验室环境中培养。放置装置时需尽可能使装置倒置或完全没入环境中, 防止封装时在内部的气泡阻碍细胞悬液与外部环境的物质交换。根据返回的环境预估培养时间, 一般培养 1 周至 1 个月。若在相对干燥的环境中培养可以适当缩短培养时间或每天定时浇水保持装置湿度, 防止内部的细胞悬液彻底干涸。

培养完成后, 将原位培养装置从培养环境中取回实验室进行进一步处理。在原位环境中培养时, 装置表面会沾染大量环境微生物, 因此在拆封之前需要对表面进行灭菌处理以尽量减少这些微生物与装置内真正培养微生物混合的可能性。使用无菌水清洗表面以初步清除装置表面附着的大颗粒污染物及环境微生物, 等待表面完全干燥后, 将装置泡入乙醇中 20–30 s, 并在层流台中风干约 30 min。完成灭菌后, 用无菌镊子将装置封口撬开取出内部培养完成的细胞悬液。

### 1.8 测序分析

本研究使用 16S rRNA 基因测序技术对环境样品及从装置内提取的细胞悬液进行测序<sup>[33–34]</sup>。按照 E.Z.N.A<sup>TM</sup> MagBind 土壤 DNA 试剂盒的使用说明进行操作, 提取测序液体的全基因组 DNA<sup>[35]</sup>。提取完成后使用 Qubit 4.0 测定其 DNA 浓度以确保提取了足够数量的高质量基因组 DNA, 并使用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性<sup>[36]</sup>。提取的 DNA 用正向引物 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和反向引物 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')进行 PCR 扩增<sup>[37]</sup>, 特异性扩增 V3–V4 区域<sup>[35]</sup>。PCR 反应由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。PCR 产物经过纯化后, 使用 Hieff NGS<sup>TM</sup> DNA

Selection Beads 进行文库构建<sup>[38]</sup>。文库构建完成后, 使用 Qubit 4.0 荧光定量仪测定文库浓度, 并使用生物分析仪进行质量控制。根据覆盖需求, 所有文库可以合并为一次测序运行。使用 Illumina MiSeq 系统对样本进行测序, 测序完成后, 使用 PEAR 软件对 Illumina 双端读取序列进行组装, 并生成单独的 fasta 和 qual 文件, 以便后续分析。

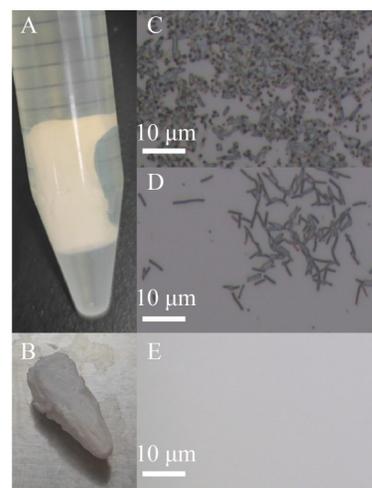
在微生物的分析和比较序列后, 只有 100% 一致的序列才能被认定为是相同的物种。为了鉴定微生物种类, 本研究将测序数据与 NCBI 数据库中 16S rRNA 基因的全长碱基序列进行比较。研究者普遍认为, 细菌 16S rRNA 基因的相似性低于 98.70% 即可被认为是新的细菌物种, 低于 94.50% 即可被认为是新的细菌属<sup>[39]</sup>。本研究测序得到的 DNA 序列已上传至 GenBank 数据库, 登录号为 KIWA00000000-KIWC00000000、KIWE00000000 - KIWM00000000 和 KIWX00000000-KIWZ00000000。

## 2 结果与分析

本研究使用的培养方法适用于微生物的单细胞培养、特定微生物群落的富集以及多种微生物的共培养实验。本研究将从环境样品中分选出的单细胞置于不含营养物质的 PBS 溶液中, 并设置了含有 10  $\mu$ L 环境样本的 PBS 溶液作为对照组。通过将这些样本封装在由聚醚砜/DMF 聚合物膜包裹的 PCR 管内, 然后送入实验室模拟环境或原位环境中进行培养, 这种方法有效防止了微生物从培养装置中逃逸。同时, 在此条件下由于管内 PBS 溶液不含营养物质, 无法为细胞提供必需的营养物质, 因此微生物的生长与繁殖必须依赖于环境渗透入 PCR 管内的可溶性营养物质。培养装置实物图如图 3A、3B 所示。

### 2.1 培养装置封装的可行性验证

Ben-Dov 等<sup>[40]</sup>通过测定被琼脂球包封的蓝



**图3** 培养装置实物图及显微镜观察结果。A-B: 培养装置实物图; C-D: 显微镜下膜浓度分别为 12.5%和25%的培养物; E: 显微镜下装置外培养基。  
Figure 3 Physical image of the cultivation device and microscopic observation results. A - B: Physical image of the cultivation device; C - D: Cultures with membrane concentrations of 12.5% and 25% under the microscope; E: External culture medium under microscope.

色葡萄糖在培养过程中的释放量, 证明了聚醚砜包覆层对可溶性营养物质的渗透性足以满足微生物生长的需求。在此基础上, 本研究将稀释至约  $10^4$  CFU/mL 的大肠杆菌以不同浓度的聚醚砜/DMF 溶液包封进培养装置, 随后将其置入无菌 LB 液体培养基中。另外将一个只装 PBS 溶液的培养装置放入含大肠杆菌的 LB 培养基作为对照组。将它们在实验室条件下培养一周。培养结束后, 在显微镜下观察实验结果并使用分光光度法检测大肠杆菌的丰度及外部培养基是否被污染, 实验结果如图 3C-3E 所示。不同浓度聚醚砜/DMF 聚合物膜培养情况的实验结果如表 1 所示。

### 2.2 污水样本

将在污水中培养 1 个月的培养装置取回实验室, 对装置内的细胞悬液进行 16S rRNA 基因鉴定。鉴定结果显示, 在仅含有单细胞的培养

装置中共得到 29 株细菌，其中 7 株与 NCBI 数据库中 16S rRNA 基因全长的相似性小于 95.00%，证明它们极有可能是新物种。MiSeq 高通量测序结果显示，在这些菌株中，分选的争论贪噬菌(*Variovorax paradoxus*)的丰度高达 78.41%，其次为待定根瘤菌(*Candidatus Rhizobiaceae*)占 6.81%，德氏食酸菌(*Acidovorax delafieldii*)占 6.48%，军团菌属(*Legionella*\_sp.)占 1.80%，中间短波单胞菌(*Brevundimonas intermedia*)占 1.75%，其他占 1.67%。在其余条件相同的培养装置内放入环境样本作为对照组，对照组培养物经鉴定后得到了 82 株细菌，其中争论贪噬菌(*Variovorax paradoxus*)仅占 14.59%。单细胞培养组与培养后对照组的群落组成对比如图 4A 所示。

### 2.3 土壤样本

本研究在土壤中孵育单细胞微生物时使用了 3 种不同浓度的聚醚砜/DMF 溶液进行包封，并将制作完成的培养装置包埋于土壤中进行原位培养，同时在实验室模拟环境的土壤悬液中培养相同时间作为对比。培养结束后，将在土壤与土壤悬液中培养 3 周的培养装置取回实验室，随后对所有培养装置内的细胞悬液分别进行 16S rRNA 基因鉴定。

在聚合物膜浓度为 12.5%、15% 和 20% 的培养装置中，均分选了施氏假单胞菌

(*Pseudomonas stutzeri*)的单细胞。高通量测序结果显示，最终得到的丰度分别为 95.21%、96.46% 和 99.18%。3 种浓度包封的样本与物种关系图如图 5A 所示。其中，在膜浓度为 20% 的培养装置中共得到 14 株细菌，这 14 株细菌中有 4 株与 NCBI 数据库中 16S rRNA 基因全长的相似性小于 95.00%，证明它们极有可能是新物种。相比之下，对照组的环境样本培养物经鉴定后得到了 151 株细菌，其中施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)的比例仅为 2.25%。膜浓度为 20% 的单细胞培养组与培养后对照组的群落组成对比如图 4B 所示。

鉴定后在分选了待定鞘氨醇单胞菌(*Candidatus Sphingomonas*)单细胞的 15% 聚醚砜/DMF 聚合物膜包裹的培养装置中共得到 31 株细菌，这 31 株细菌中有 9 株与 NCBI 数据库中 16S rRNA 基因全长的相似性小于 95.00%，证明它们极有可能是新物种。其中，分选的待定鞘氨醇单胞菌(*Candidatus Sphingomonas*)丰度为 71.08%，经过 NCBI BLAST 比对分析后证明其为未培养微生物。

此外，本研究同样将施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)分选到土壤悬液培养的培养装置内，包封所用的膜浓度为 12.5%。经 16S rRNA 基因鉴定后共得到 81 株细菌，其中施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)的比例为

表1 不同浓度聚醚砜/DMF聚合物膜培养情况对比

Table 1 Comparison of cultivation conditions of polyether sulfone/DMF polymer membrane with different concentrations

膜浓度 Membrane concentration (%)	培养基被污染率 Contamination rate of culture medium (%)	大肠杆菌丰度 <i>E. coli</i> abundance (CFU/mL)
10.0	70	$3 \times 10^9$
12.5	20	$1 \times 10^9$
15.0	0	$6 \times 10^8$
20.0	0	$3 \times 10^8$
25.0	0	$5 \times 10^5$

每种浓度进行10组重复实验，浓度取10组平均值计算。

Conduct 10 repeated experiments for each concentration, and calculate the average of the 10 concentrations.

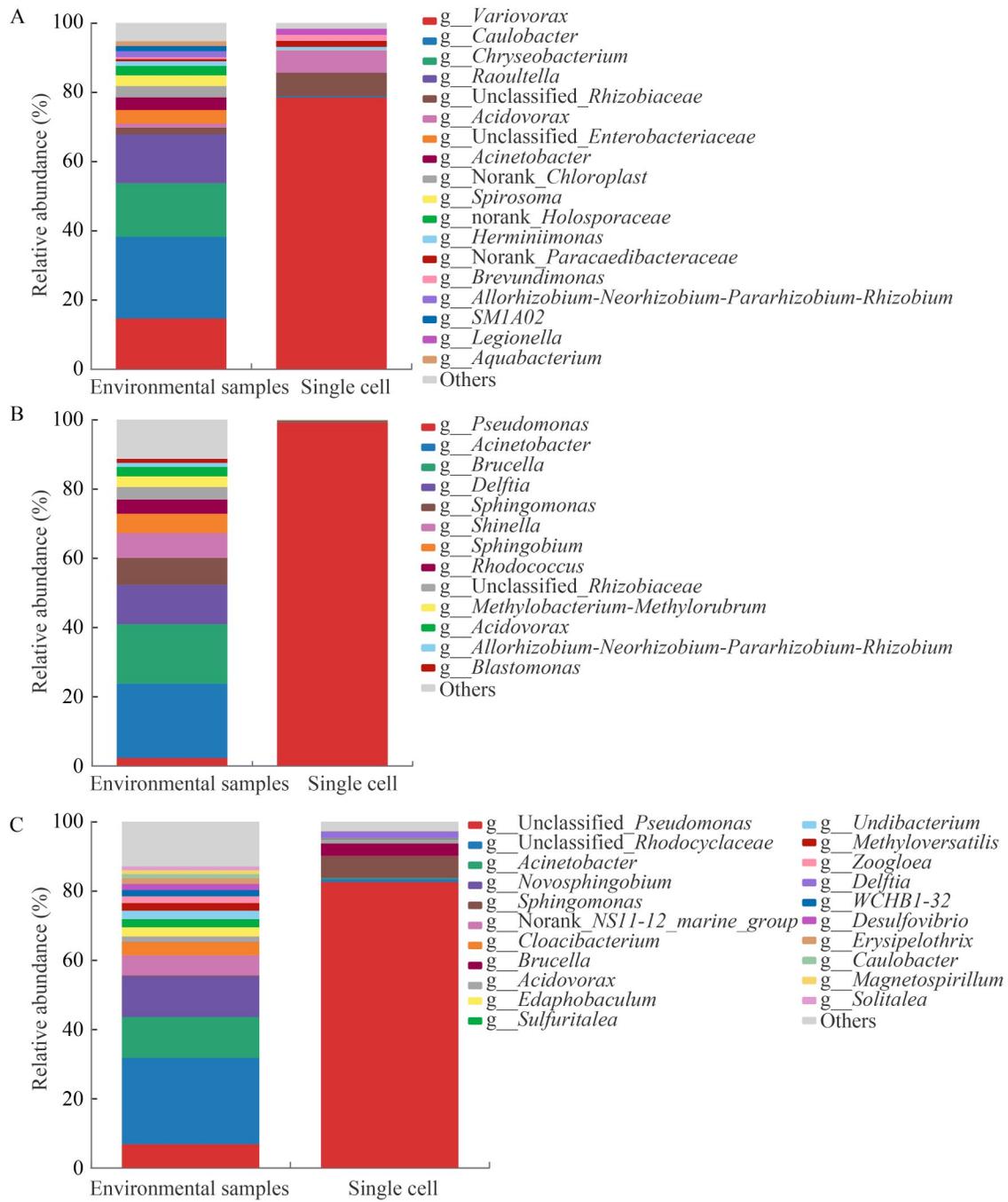


图4 单细胞培养组与对照组的群落组成对比。A: 污水; B: 土壤; C: 山泉水。

Figure 4 Comparison of community composition between single-cell culture group and control group. A: Wastewater; B: Soil; C: Mountain spring water.

91.66%。相比之下, 在土壤培养的同膜浓度包封的培养装置中仅鉴定出 54 株细菌, 这表明培养装置在流体环境中培养时聚合物膜更容易受到腐蚀。

土壤培养与土壤悬液培养的对比如图 5B 所示。

## 2.4 山泉水样本

为了模拟山泉水初始环境, 本研究将舍山



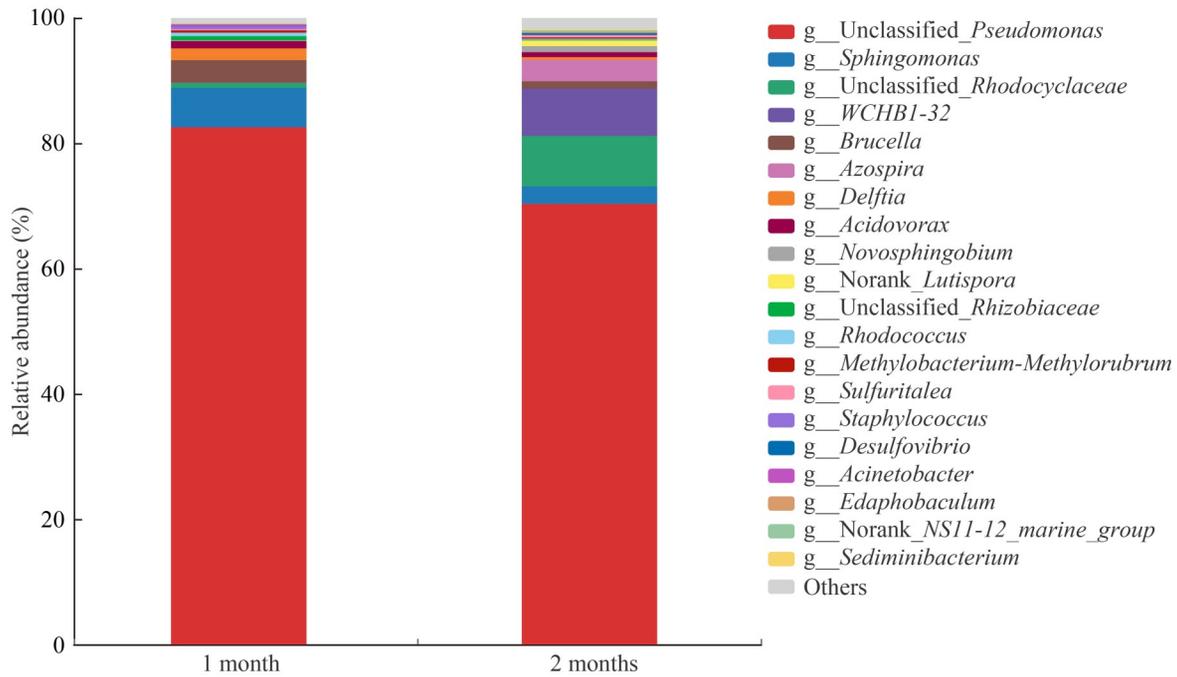


图6 长白山山泉水样本低温培养1个月与2个月对比

Figure 6 Comparison of low temperature cultivation of Changbai Mountain spring water samples for one month and two months.

醇单胞菌(*Candidatus Sphingomonas*)丰度最高, 占 29.91%, 其次为待定假单胞菌(*Candidatus Pseudomonas*)占 5.07%, 剩下的都小于 5.00%。在培养后对照组中这种待定鞘氨醇单胞菌(*Candidatus Sphingomonas*)丰度下降至 0.20%。以上实验结果同样表明本研究设计的新型原位培养装置能够富集所分选的未培养微生物, 但通过对比培养不同时间的实验组数据, 发现培养时间过长会导致聚合物膜被环境腐蚀, 使微生物通过聚合物膜微小通孔自由出入, 从而影响最终实验结果的局限性同样不容忽视。

### 3 讨论与结论

在微生物多样性的研究领域, 传统培养方法的局限性日益凸显。自然界中仅有约 1% 的微生物能够通过标准培养技术在实验室条件下生长, 而余下 99% 无法在实验室中培养的则被称为“未培养微生物”<sup>[1-2,41]</sup>。这些未培养微生物可

能拥有独特的代谢途径和生物活性物质, 对于生物技术、医药开发以及生态学研究具有重要价值<sup>[42-44]</sup>。然而, 由于它们在实验室条件下难以生长和繁殖, 严重限制了研究人员对这些微生物资源的开发和利用。近年来, 随着对未培养微生物领域的持续探索, 众多研究人员开发并使用新的培养技术对未培养微生物进行研究。2002 年, Kaeberlein 等设计并使用了扩散室(diffuser chamber)技术来分析海洋沉积物中的微生物组成<sup>[45]</sup>, 尽管扩散室技术比传统培养技术获得了高达 300 倍的海洋沉积物微生物获取率<sup>[46]</sup>, 但其在微生物的高通量培养方面仍存在局限性。2009 年, Ben-Dov 等<sup>[40]</sup>提出了一种双封装(double encapsulation)技术, 通过先将微生物封装在琼脂球内, 再将琼脂球包裹在聚合物膜中, 最后返回原位环境中培养, 尽管双封装技术满足了在不同环境中培养的需求, 但回收琼脂球内的培养物却十分困难, 且其在微生物

表2 培养1个月与2个月后高通量测序检测到的所有微生物物种占比

Table 2 Proportion (%) of all microbial species detected by high-throughput sequencing after 1 month and 2 months of culture

物种 Species	1个月 One month	2个月 Two months
Unclassified_ <i>Pseudomonas</i>	82.36	68.62
Unclassified_ <i>Sphingomonas</i>	6.27	2.76
<i>Brucella_melitensis</i>	3.61	1.19
<i>Delftia_tsuruhatensis</i>	1.88	0.42
<i>Acidovorax_delafieldii</i>	1.17	0.79
Unclassified_ <i>Rhodocyclaceae</i>	0.79	8.07
Unclassified_ <i>Rhizobiaceae</i>	0.68	0.11
<i>Rhodococcus_erythropolis</i>	0.55	0.17
<i>Staphylococcus_caprae</i>	0.45	–
<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	0.36	0.21
<i>Acinetobacter_baumannii</i>	0.31	–
<i>Pseudomonas_azotoformans</i>	0.20	0.82
<i>Sulfuritalea_sp.</i>	0.17	0.37
Unclassified_ <i>Novosphingobium</i>	0.13	0.71
<i>Paracoccus_yeei</i>	0.10	0.03
<i>Sediminibacterium_sp.</i>	0.06	0.13
<i>WCHB1-32_sp.</i>	0.04	7.53
<i>Caulobacteraceae_sp.</i>	0.03	0.11
<i>Desulfovibrio_mexicanus</i>	0.03	0.16
Unclassified_ <i>Desulfovibrio</i>	0.03	0.17
<i>Hyphomicrobium_zavarzinii</i>	0.03	0.10
<i>Edaphobaculum_sp.</i>	0.02	0.23
<i>NS11-12_marine_group_sp.</i>	0.02	0.22
<i>Bacteroidetes_bacterium_37-13_sp.</i>	0.01	0.10
<i>Caulobacter_sp.</i>	0.01	0.14
<i>Novosphingobium_aromaticivorans</i>	–	0.26
<i>Limnohabitans_parvus</i>	–	0.11
<i>Azospira_oryzae</i>	–	3.43
<i>Pseudomonas_thivervalensis</i>	–	0.91
<i>Lutispora_sp.</i>	–	0.90
Others	0.70	1.23

–: 未检测到, others合并相对丰度小于0.10%。

–: Not detected, others combined relative abundance is less than 0.10%.

的高通量培养方面依然存在局限性。直至2010年,分离芯片(isolation chip, I-Chip)技术的问世<sup>[22]</sup>彻底解决了培养通量不足的问题,标志着原位培养技术进入了一个新的阶段<sup>[9]</sup>。I-Chip由一块两

面包裹聚碳酸酯微孔膜的通孔板与两侧固定微孔膜的分离板组成,通孔板与分离板之间形成多个微型扩散室,在每个室中接种单个环境细胞,并最终放回自然环境中培养。自I-Chip问

世以来, 众多研究者围绕 I-Chip 对未培养微生物进行研究, 例如 Sizova 等<sup>[14]</sup>利用 I-Chip 研究口腔中未培养的细菌; Ling 等<sup>[25]</sup>利用 I-Chip 培养装置分离得到一个能产生新化合物的未培养菌种; Zhao 等<sup>[47]</sup>利用改良 I-Chip 培养温泉中的耐热微生物。虽然 I-Chip 确实为未培养微生物领域的研究开辟了广阔的道路, 但 I-Chip 装置形成的微型扩散室之间容易交叉污染且其在微生物的选择性分离方面存在一定局限性。2014 年, Dawoon 等<sup>[48]</sup>研究出 isolation tip (I-tip) 技术用于分离海绵共附生微生物, 但其无法在流体中培养也限制了许多应用场景。

本研究设计的技术由于聚合物膜具有的选择渗透性及被培养的微生物处于液体环境中, 能满足在各种不同环境中培养且培养的微生物可实现在培养后再次进行选择分离。本研究为了验证在新型原位培养装置中使用“先分选, 再培养”方法进行培养的可行性, 在 3 种不同环境进行实验(长白山山泉水、土壤和实验室生活污水), 这 3 种环境对应了 3 种不同的培养条件, 其中长白山山泉水对应低温环境培养, 土壤对应陆地环境培养, 实验室生活污水对应液体环境培养。这些实验的结果表明, 本研究设计的培养技术与传统培养方法相比能够分离出更多的微生物种类和数量。然而, 由于在本研究原位培养实验中培养腔室内放入了无营养物质的 PBS 溶液, 培养结束后经鉴定单细胞微生物富集效果表现良好, 说明 3 种环境中的营养物质成功通过聚合物膜的微小通孔进入了培养装置。基于此, 若后续实验中对特定微生物的培养条件有所了解, 通过在培养腔室内引入相应的培养基, 预期培养效率与丰度将得到进一步提升。此外, 本研究成功培养了原来实验室环境下无法培养的微生物, 并从中培育出新的物种。同时, 本研究设计的培养技术解决了过去技术中存在的一些问题, 如培养后再次进行选择分离困难和无法适应各种复杂的自然环境等。在研究过程中, 我们意识到本研究具有 2 方面的

局限性。(1) 尽管包封的聚合物膜在经过数月的培养中依旧完好, 但通过对比长白山山泉水原位环境培养 1 个月与 2 个月的培养结果发现, 在环境中出现了一些白色碎屑, 随着时间变化这些碎屑逐渐增多。通过测试其拉曼信号并与数据库比对后证明其为聚合物膜的碎屑, 说明聚合物膜在长期液体环境的培养中可能会被腐蚀或稀释一小部分。在长白山山泉水原位培养 2 个月后鉴定结果相比培养 1 个月的结果中多了 13 株细菌, 且分选入培养装置的待定假单胞菌 (*Candidatus Pseudomonas*) 丰度降低明显, 表明随着聚合物膜被腐蚀或稀释, 外部微生物进入培养装置的可能性会增加, 即聚合物膜被腐蚀可能导致实验结果的不准确<sup>[49-50]</sup>。(2) 本研究的各项实验数据表明, 本研究设计的培养装置无法彻底根绝微生物通过聚合物膜进入和逃逸。为了解决此问题, 可以在不影响包封后营养物质的透过性的情况下重复多次包封。

综上所述, 本研究开发的微生物新型原位培养装置和“先分选, 再培养”方法首次在培养装置的培养腔室内使用液体进行原位培养, 并且在提高单细胞培养成功率、特定微生物的富集效率以及未培养微生物的培养成功率等方面展现出巨大的潜力。本研究使用的技术相较于传统培养技术不仅成功分离和培养出更多的微生物数量, 还成功培养了以前无法在实验室条件下培养的微生物, 这对于微生物学和生态学的研究具有重要意义。本研究已成功验证培养装置在液体环境、固体环境及低温环境的可培养性。在后续的研究中, 若将本研究设计的新型原位培养装置应用于更多复杂的生态系统, 如深海或高温等极端环境, 通过研究这些环境中的微生物, 有助于揭示微生物在极端条件下的代谢特点及其生物活性物质, 为生物技术、医药开发以及生态学研究等领域提供新的理论依据和技术支持。然而, 不可否认的是, 培养装置仍有诸多方面有待优化与改进。在后续的研究中可以对封装材料进行优化, 对于聚合物

膜培养一段时间后在液体环境中出现碎屑及防微生物逃逸效果衰减的问题,可着重开发不同聚合物材料或对现有聚醚砜/DMF 聚合物膜进行改进。选用更稳定、抗腐蚀性更强且对微生物生长不产生负面影响的材料,确保其在复杂的自然环境中长时间培养过程中不被腐蚀,从而防止微生物逃逸和外部微生物污染。同时可以考虑对装置结构进行改进,优化原位培养装置的结构设计,以提升其培养效率和适用性。后续可考虑设计可重复使用的原位培养装置,以减少对环境的影响,或考虑设计新的结构替代本研究使用的装置主体,将操作方法优化以减少人为操作对实验结果造成的影响。

## 作者贡献声明

金呈辉:论文构思、形式分析、调查研究、验证;何冰欢:数据管理、调查研究;赵丽茹:数据管理;张保健:数据管理;李备:论文构思、指导。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] EPSTEIN S. The phenomenon of microbial uncultivability[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(5): 636-642.
- [2] RAPPÉ MS, GIOVANNONI SJ. The uncultured microbial majority[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 369-394.
- [3] HUG LA, BAKER BJ, ANANTHARAMAN K, BROWN CT, PROBST AJ, CASTELLE CJ, BUTTERFIELD CN, HERNSDORF AW, AMANO Y, ISE K, SUZUKI Y, DUDEK N, RELMAN DA, FINSTAD KM, AMUNDSON R, THOMAS BC, BANFIELD JF. A new view of the tree of life[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1: 16048.
- [4] CASTELLE CJ, BANFIELD JF. Major new microbial groups expand diversity and alter our understanding of the tree of life[J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1181-1197.
- [5] 杨永华,姚健. 分子生物学方法在微生物多样性研究中的应用[J]. *生物多样性*, 2000, 8(3): 337-342.  
YANG YH, YAO J. Molecular techniques and their application to the study of microbial diversity[J]. *Biodiversity Science*, 2000, 8(3): 337-342 (in Chinese).
- [6] HAMADY, MICAH LAIRD. Exploring microbial sequence and community diversity on an unprecedented scale[D]. Boulder: University of Colorado at Boulder, 2009.
- [7] STEWART EJ. Growing unculturable bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(16): 4151-4160.
- [8] BROWNE HP, FORSTER SC, ANONYE BO, KUMAR N, ANNE NEVILLE B, STARES MD, GOULDING D, LAWLEY TD. Culturing of ‘unculturable’ human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation[J]. *Nature*, 2016, 533 (7604): 543-546.
- [9] BERDY B, SPOERING AL, LING LL, EPSTEIN SS. *In situ* cultivation of previously uncultivable microorganisms using the ichip[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(10): 2232-2242.
- [10] LAGIER JC, KHELAIFIA S, ALOU MT, NDONGO S, DIONE N, HUGON P, CAPUTO A, CADORET F, TRAORE SI, SECK EH, DUBOURG G, DURAND G, MOUREMBOU G, GUILHOT E, TOGO A, BELLALI S, BACHAR D, CASSIR N, BITTAR F, DELERCE J, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1: 16203.
- [11] HURST CJ. Divining the future of microbiology[J]. *ASM News*, 2005, 71(6): 262-263.
- [12] LEWIS K, EPSTEIN S, D’ONOFRIO A, LING LL. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2010, 63(8): 468-476.
- [13] NICHOLS D, CAHOON N, TRAKHTENBERG EM, PHAM L, MEHTA A, BELANGER A, KANIGAN T, LEWIS K, EPSTEIN SS. Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of “uncultivable” microbial species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2445-2450.
- [14] SIZOVA MV, HOHMANN T, HAZEN A, PASTER BJ, HALEM SR, MURPHY CM, PANIKOV NS, EPSTEIN SS. New approaches for isolation of previously uncultivated oral bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(1): 194-203.
- [15] EPSTEIN SS, ROSSEL J. Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1995, 117: 289-298.
- [16] EPSTEIN SS, ALEXANDER D, COSMAN K, DOMPÉ A, GALLAGHER S, JARSOBSKI J, LANING E, MARTINEZ R, PANASIK G, PELUSO C, RUNDE R, TIMMER E. Enumeration of sandy sediment bacteria: are the counts quantitative or relative?[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1997, 151: 11-16.
- [17] ARMOUGOM F, RAOULT D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods[J]. *Journal of Computer Science & Systems Biology*, 2009, 2(1): 74-92.
- [18] CROSS KL, CAMPBELL JH, BALACHANDRAN M, CAMPBELL AG, COOPER CJ, GRIFFEN A, HEATON M, JOSHI S, KLINGEMAN D, LEYS E, YANG Z, PARKS JM, PODAR M. Targeted isolation and cultivation of uncultivated bacteria by reverse genomics[J].

- Nature Biotechnology, 2019, 37(11): 1314-1321.
- [19] RAVIN NV, MARDANOVA AV, SKRYABIN KG. Metagenomics as a tool for the investigation of uncultured microorganisms[J]. *Genetika*, 2015, 51(5): 519-528.
- [20] EGUCHI M, OSTROWSKI M, FEGATELLA F, BOWMAN J, NICHOLS D, NISHINO T, CAVICCHIOLI R. *Sphingomonas alaskensis* strain AFO1, an abundant oligotrophic ultramicrobacterium from the North Pacific[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(11): 4945-4954.
- [21] 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.  
ZHANG XM, ZHANG XH. New culture approaches of marine microorganisms[J]. *Marine Sciences*, 2009, 33(6): 99-104 (in Chinese).
- [22] BOLLMANN A, PALUMBO AV, LEWIS K, EPSTEIN SS. Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(22): 7413-7419.
- [23] ZENGLER K, WALCHER M, CLARK G, HALLER I, TOLEDO G, HOLLAND T, MATHUR EJ, WOODNUTT G, SHORT JM, KELLER M. High-throughput cultivation of microorganisms using microcapsules[J]. *Methods in Enzymology*, 2005, 397: 124-130.
- [24] AOI Y, KINOSHITA T, HATA T, OHTA H, OBOKATA H, TSUNEDA S. Hollow-fiber membrane chamber as a device for *in situ* environmental cultivation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3826-3833.
- [25] LING LL, SCHNEIDER T, PEOPLES AJ, SPOERING AL, ENGELS I, CONLON BP, MUELLER A, SCHÄBERLE TF, HUGHES DE, EPSTEIN S, JONES M, LAZARIDES L, STEADMAN VA, COHEN DR, FELIX CR, FETTERMAN KA, MILLETT WP, NITTI AG, ZULLO AM, CHEN C, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance[J]. *Nature*, 2015, 517: 455-459.
- [26] NICHOLS D, LEWIS K, ORJALA J, MO S, ORTENBERG R, O'CONNOR P, ZHAO C, VOUIROS P, KAEBERLEIN T, EPSTEIN SS. Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow *in vitro*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4889-4897.
- [27] EPSTEIN SS. General model of microbial uncultivability [M]/*Uncultivated Microorganisms*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009: 131-159.
- [28] PORTER KG, FEIG YS. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora[J]. *Limnology and Oceanography*, 1980, 25(5): 943-948.
- [29] EPSTEIN S, LEWIS K, NICHOLS D, GAVRISH E. New approaches to microbial isolation[J]. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2010: 3-12. DOI: 10.1128/9781555816827.CH1.
- [30] 李春楠, 崔海瑞, 王伟博. 用SRAP标记研究根际土壤微生物的遗传多样性[J]. *生物多样性*, 2011, 19(4): 485-493.  
LI CN, CUI HR, WANG WB. Genetic diversity in rhizosphere soil microbes detected with SRAP markers[J]. *Biodiversity Science*, 2011, 19(4): 485-493 (in Chinese).
- [31] LIANG P, LIU B, WANG Y, LIU KX, ZHAO YP, HUANG WE, LI B. Isolation and culture of single microbial cells by laser ejection sorting technology[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(3): e0116521.
- [32] 荣楠, 李备, 唐昊冶, 林先贵, 冯有智. 微生物菌种筛选技术方法研究进展[J]. *土壤*, 2021, 53(2): 236-242.  
RONG N, LI B, TANG HY, LIN XG, FENG YZ. Advances in strain isolating technique and method for microorganisms[J]. *Soils*, 2021, 53(2): 236-242 (in Chinese).
- [33] SHIQIANG S, WENLAN H, HUIMIN YU. Detection of bacterial DNA with polymerase chain reaction and reverse hybridization of 16S rRNA gene[J]. *Chinese Journal of Infectious Diseases*, 1999, 17: 30-32.
- [34] MICHAEL JANDA J, ABBOTT SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(9): 2761-2764.
- [35] WU XY, ZHANG HH, CHEN J, SHANG S, WEI QG, YAN JK, TU XY. Comparison of the fecal microbiota of dholes high-throughput Illumina sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(8): 3577-3586.
- [36] 占爱瑶, 罗培高. DNA测序技术概述[J]. *生物技术通讯*, 2011, 22(4): 584-588.  
ZHAN AY, LUO PG. The overview of DNA sequencing technology[J]. *Letters in Biotechnology*, 2011, 22(4): 584-588 (in Chinese).
- [37] 邓瑞玲. 使用改进的采样装置及高通量测序技术对医院厌氧池污泥菌群的研究[D]. 锦州: 锦州医科大学硕士学位论文, 2023.  
DENG RL. Study on sludge flora in hospital anaerobic pool using improved sampling device and high-throughput sequencing technology[D]. Jinzhou: Master's Thesis of Jinzhou Medical University, 2023 (in Chinese).
- [38] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163.
- [39] YARZA P, YILMAZ P, PRUESSE E, GLÖCKNER FO, LUDWIG W, SCHLEIFER KH, WHITMAN WB, EUZÉBY J, AMANN R, ROSSELLÓ-MÓRA R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(9): 635-645.
- [40] 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.
- [41] LLOYD KG, STEEN AD, LADAU J, YIN JQ, CROSBY L. Phylogenetically novel uncultured microbial cells dominate earth microbiomes[J]. *mSystems*, 2018, 3(5): e00055-18.
- [42] NARIHIRO T, KAMAGATA Y. Cultivating yet-to-be cultivated microbes: the challenge continues[J]. *Microbes and Environments*, 2013, 28(2): 163-165.
- [43] TYSON GW, BANFIELD JF. Cultivating the

- uncultivated: a community genomics perspective[J]. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(9): 411-415.
- [44] IMACHI H, NOBU MK, NAKAHARA N, MORONO Y, OGAWARA M, TAKAKI Y, TAKANO Y, UEMATSU K, IKUTA T, ITO M, MATSUI Y, MIYAZAKI M, MURATA K, SAITO Y, SAKAI S, SONG CH, TASUMI E, YAMANAKA Y, YAMAGUCHI T, KAMAGATA Y, et al. Isolation of an archaeon at the prokaryote-eukaryote interface[J]. *Nature*, 2020, 577(7791): 519-525.
- [45] KAEBERLEIN T, LEWIS K, EPSTEIN SS. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1127-1129.
- [46] BOLLMANN A, LEWIS K, EPSTEIN SS. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(20): 6386-6390.
- [47] ZHAO JT, SHAKIR Y, DENG YL, ZHANG Y. Use of modified ichip for the cultivation of thermo-tolerant microorganisms from the hot spring[J]. *BMC Microbiology*, 2023, 23(1): 56.
- [48] DAWOON J, EUN-YOUNG S, EPSTEIN SS, YOCHAN J, JAEMIN H, PARFENOVA VV, BELYKH OI, GLADKIKH AS, SEOK AT. Application of a new cultivation technology, I-tip, for studying microbial diversity in freshwater sponges of Lake Baikal, Russia[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015(2): 417-423.
- [49] 郎延贺. 海洋环境中微纳米改性膜聚合物表面微生物污损机理研究[D]. 黑龙江: 东北林业大学博士学位论文, 2023.  
LANG YH. Study on the mechanism of microbial fouling on the surface of micro nano modified membrane polymer in marine environment[D]. Heilongjiang: Doctoral Dissertation of Northeast Forestry University, 2023 (in Chinese).
- [50] 方立峰. 聚合物微孔膜表面改性及性能研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2015.  
FANG LF. Study on surface modification and properties of polymer microporous membrane[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2015 (in Chinese).