



利用培养组学技术分离培养肺部微生物群研究

刘月姣¹, 李俭杰², 孙一凡¹, 黄自然¹, 李军峰², 安彤同², 卓明磊², 迟雨佳², 李生², 杨晓丹², 颊博², 潘志远¹, 杨瑞馥¹, 王子平^{2*}, 毕玉晶^{1*}

1 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所, 北京 100071

2 北京大学肿瘤医院胸部肿瘤内一科, 北京 100142

刘月姣, 李俭杰, 孙一凡, 黄自然, 李军峰, 安彤同, 卓明磊, 迟雨佳, 李生, 杨晓丹, 颊博, 潘志远, 杨瑞馥, 王子平, 毕玉晶. 利用培养组学技术分离培养肺部微生物群研究. *微生物学报*, 2022, 62(3): 1110–1118.

Liu Yuejiao, Li Jianjie, Sun Yifan, Huang Ziran, Li Junfeng, An Tongtong, Zhuo Minglei, Chi Yujia, Li Sheng, Yang Xiaodan, Jia Bo, Pan Zhiyuan, Yang Ruifu, Wang Ziping, Bi Yujing. Isolation and cultivation of lung microbiota with culturomics. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 1110–1118.

摘要: 【目的】使用培养组学技术分离培养肺部微生物群, 初步了解人体肺部可培养细菌的组成特点, 建立呼吸道微生物菌库, 为以后进行重点菌株的功能研究提供菌株条件。【方法】针对6个临床肺泡灌洗液样本, 使用补充不同添加剂的血培养瓶对样本进行预增菌, 在预增菌不同的时间点对血培养瓶内细菌进行分离培养和保藏, 使用MALDI-TOF质谱和16S rRNA基因测序鉴定分离菌株。【结果】共获得101种已鉴定细菌, 6株潜在新菌, 2株真菌。其中细菌包括5个门、14个纲、24个目、35个科和45个属。预增菌前期的时间点分离菌种数较多, 厌氧环境分离菌种多于需氧条件, 在预增菌时添加羊血和瘤胃液起到良好的分离效果, 本实验分离的肺部微生物群与人体其他部位(尤其是肠道)有很大的交叉。【结论】利用培养组学技术可以实现对肺部微生物群的分离培养, 继续探索对肺部微生物群培养的优化方法具有现实意义。

关键词: 培养组学; 肺部微生物群; 肺泡灌洗液; 方法优化

基金项目: 北京大学肿瘤医院科学基金(2017-18)

Supported by the Science Foundation of Peking University Cancer Hospital (2017-18)

*Corresponding authors. BI Yujing, Tel: +86-10-66948562, E-mail: byj7801@sina.com; WANG Ziping, Tel: +86-10-88196660, E-mail: wangzp2007@126.com

Received: 7 July 2021; Revised: 14 September 2021; Published online: 29 September 2021

Isolation and cultivation of lung microbiota with culturomics

LIU Yuejiao¹, LI Jianjie², SUN Yifan¹, HUANG Ziran¹, LI Junfeng², AN Tongtong², ZHUO Minglei², CHI Yujia², LI Sheng², YANG Xiaodan², JIA Bo², PAN Zhiyuan¹, YANG Ruifu¹, WANG Ziping^{2*}, BI Yujing^{1*}

¹ State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China

² Department of Thoracic Oncology, Peking University Cancer Hospital, Beijing 100142, China

Abstract: [Objective] To understand the composition and characteristics of the human lung microbiota, and build a respiratory tract microbial bank which provides strains for further study, we isolated lung microbiota with culturomics. [Methods] Six clinical alveolar lavage fluid samples were collected, and blood culture bottles supplemented with different additives were used to pre-enrich the samples. The strains in the blood bottles were isolated, cultured, and preserved at different time points of the pre-enrichment. Isolated strains were identified with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry or 16S rRNA gene sequencing. [Results] A total of 101 known bacterial species, 6 potential new bacterial species, and 2 fungal species were obtained. The bacteria belonged to 45 genera, 35 families, 24 orders, 14 classes of 5 phyla. More isolates were obtained from the early stage of pre-enrichment, and there were more isolates in the anaerobic environment than at aerobic conditions. The additional supplement of sheep blood and rumen fluid during pre-enrichment were beneficial to strain isolation. The lung bacteria isolated in this experiment overlapped to a large extent with those from other parts (especially the intestine) of the human body. [Conclusion] Culturomics realizes the isolation of lung microbiota, and it is essential to continue to optimize the methods for isolating more bacteria from lungs.

Keywords: culturomics; lung microbiota; alveolar lavage fluid; method optimization

近年来,人们对呼吸道微生物群的组成和功能作用越来越感兴趣。科学界曾经认为,肺部不存在微生物,这可能是由于呼吸道微生物群的丰度较低,并且传统的培养方法过多关注的是生长较快的需氧病原菌^[1]。然而,随着细菌培养方法(如培养组学)的改进和测序技术的发展,“肺部无菌”这一陈旧观点已经被推翻^[2],研究者们渐渐认识到健康人的气道内存在共生微生物,且这些微生物群落的变化与一些呼吸道疾病相关,包括肿瘤、哮喘、慢性阻塞性肺病等^[3-7]。

虽然不依赖培养的测序技术为我们探究呼吸道微生物群对人体的健康影响提供了大量有

意义的信息^[8],但测序技术的检测阈值较高,即低丰度细菌可能无法通过测序检出;同时在DNA提取和分析时可能产生偏差,导致不同分析方法得到的结论不一致,而这些不足可以通过培养组学技术加以弥补^[9]。更重要的是,培养组学获得的细菌菌株可以让研究者实现在菌株水平上研究细菌与健康或疾病的关系。因此,关键微生物的培养是探索特定微生物和微生物群落与宿主健康关系的关键一步。

Lagier等总结了18种人体肠道细菌的最佳培养条件,强调了在培养过程中使用血培养瓶延长增菌时间的重要性,并将血培养瓶、瘤胃液和羊血确定为肠道微生物群生长的3种关键

营养物质^[10]。目前,有关呼吸道微生物培养相关的研究较少,尚未有文献报道使用培养组学的方法培养肺部微生物群。本研究采用培养组学方法对肺泡灌洗液微生物群进行分离培养,以期对人体肺部可培养菌种的组成特点有一个初步了解,为呼吸道微生物群培养条件的优化积累经验。

1 材料与方法

1.1 样本采集

样本采集自 3 名因“发现肺部肿块”在北京大学肿瘤医院接受支气管镜检查的患者。为了排除口腔或上呼吸道微生物对样本的污染,在样本采集前,首先让患者使用磷酸盐缓冲盐水漱口 3 次,然后再使用纤维支气管镜采集肺泡灌洗液。每名病人双侧肺叶的灌洗液分开取样,取出的灌洗液收集在 50 mL 无菌离心管里(样本编号为 L1-L6),置于 4 °C 的环境中并快速运送到实验室。本研究获得了北京大学肿瘤医院机构审查委员会的伦理批准(中国北京,审查编号:2018KT89),3 名受试者均签署了知情同意书。

1.2 主要器材和试剂

血培养瓶(BC12, 郑州安图公司);脱脂绵羊血(H0011, 北京宝特医疗有限公司);瘤胃液(A386-01, ELITE-MEDIA);裂解液和质谱基质(郑州安图公司);BHI (237500, BD);DNeasy Blood & Tissue Kit 抽提试剂盒(kit 69506, QIAGEN);无菌过滤器(431096, Corning);50 mL 无菌离心管(430828, Corning)。

1.3 实验仪器

MALDI-TOF 质谱仪(Autof MS1000, 郑州安图公司);恒温振荡培养箱(HZQ-F160, 宿州培英实验设备有限公司);厌氧培养箱(INVIVO2 400, 英国 Ruskinn 公司);恒温培养箱(DH3600AB,

天津市泰斯特仪器有限公司)等。

1.4 培养基

本实验中所用到的固体培养基为商品化的哥伦比亚血平板(PB0123A, OXOID),液体培养基使用添加 5%脱脂绵羊血的过滤除菌 BHI 培养基。

1.5 肺部微生物群的分离培养

分离培养肺部微生物群的方法参照既往分离肠道微生物群的方法^[11-12]。具体步骤包括使用血培养瓶对样本进行预增菌和各时间点的分离培养。鉴定方法使用 MALDI-TOF 质谱鉴定和 16S rRNA 基因测序鉴定(图 1)。

1.5.1 样本预增菌

每个样本需要准备需氧和厌氧的上机血培养瓶各 2 个,分别加入 5 mL 的无菌澄清瘤胃液和 5 mL 的羊血,这样就形成了 4 种预增菌的环境,分别为添加羊血的需氧上机血培养瓶、添加瘤胃液的需氧上机血培养瓶、添加羊血的厌氧上机血培养瓶以及添加瘤胃液的厌氧上机血培养瓶。在准备好的血瓶中加入 0.5 mL 的灌洗液样本,在 37 °C 需氧或厌氧的培养条件下共增菌 27 d。

1.5.2 分离培养

在样本采集当天取 0.1 mL 样本原液做倍比稀释至 10^{-10} 倍,按稀释梯度将稀释液均匀涂布在血平板上。待平板上长出克隆菌落后,挑取大小、颜色、形状不同的克隆分别接入到液体培养基中增菌。液体增菌完成后,按照 20%甘油+80%菌液的比例将菌液置于 1.5 mL 冻存管中冻存于-80 °C,并在血平板上三区划线以备菌种鉴定使用。培养过程中需氧条件在生物安全柜中完成后将所有培养基置于 37 °C 恒温培养箱中培养 1d;厌氧条件在厌氧箱中完成后将所有培养基置于 37 °C 厌氧箱中培养 3 d。

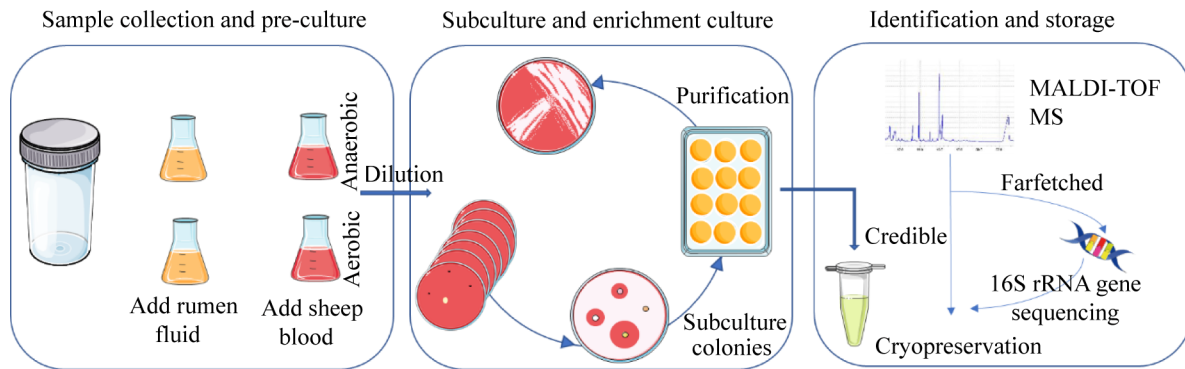


图 1 培养组学工作流程示意图

Figure 1 Flow chart of culturomics. There are three parts of culturomics. First, samples are added to the aerobic/anaerobic blood culture bottles supplemented with sheep blood and rumen fluid for pre-enrichment. Second, on the 0th, 3rd, 6th, 9th, 15th, and 27th days, samples were taken from the blood culture bottles for dilution and coating. Pick the single colony and put it into the liquid medium for amplification. Then one part of bacteria was frozen at -80°C , and the other part was used for identification. Third, pick a single colony grown on the plate for MALDI-TOF identification. If the identification result is unreliable, the colony will be identified again by 16S rRNA gene sequencing. All aerobic bacteria were cultured at 37°C for 1 day, and anaerobic bacteria were cultured for 3 days.

分别在预增菌的第 3、6、9、15、27 天 5 个时间点抽取各个条件下的血培养瓶中的混合菌液重复上述操作。

1.6 菌种鉴定

从细菌的三区划线板上挑取单克隆均匀涂在 MALDI-TOF 质谱板检测孔上, 滴加 $1\ \mu\text{L}$ 裂解液裂解细菌, 充分反应后滴加 $1\ \mu\text{L}$ 质谱基质液, 待基质晾干后上机检测。若检测结果 ≥ 9 则为可信。提取鉴定结果为不可信的细菌 DNA 并使用特异性引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 对其进行 16S rRNA 基因测序。如果 16S rRNA 基因序列与已知物种的相似度低于 98.65%, 则认为它是一个潜在的新物种^[13]。

1.7 培养菌种分类

菌种鉴定完成后, 使用人体分离细菌数据库 (http://hpr.mediterranee-infection.com/arkotheque/client/ihu_bacteria/recherche/index.php)、细菌多样性元数据库 (<https://bacdiv.dsmz.de/>) 以

及 PubMed 进行文献搜索将所有分离菌种按照既往在人体及环境的分离部位分成 5 类进行分析比较。

2 结果与分析

2.1 肺部微生物群分离培养情况

从 6 个肺泡灌洗液样本中共分离鉴定了 834 个细菌克隆, 由 5 个门、14 个纲、24 个目、35 个科、45 个属和 101 个种组成(图 2A)。其在门水平上包括厚壁菌门(50%)、放线菌门(21%)、变形菌门(15%)、拟杆菌门(10%)和梭杆菌门(4%); 在属的水平上以链球菌属、葡萄球菌属、韦荣氏菌属、放线菌属、棒状杆菌属、普氏菌属、奈瑟菌属和梭菌属为主(表 1)。这一结果与先前 Zhuo 等^[14]报道的对大样本肺泡灌洗液进行 16S rRNA 基因扩增子测序的结果基本吻合, 但是使用培养组学的方法对放线菌门做了补充。图 2C 展示了 101 个细菌物种在 6 个样本中的分布情况及分离次数。6 个样本之间的重叠量如图 2B 所

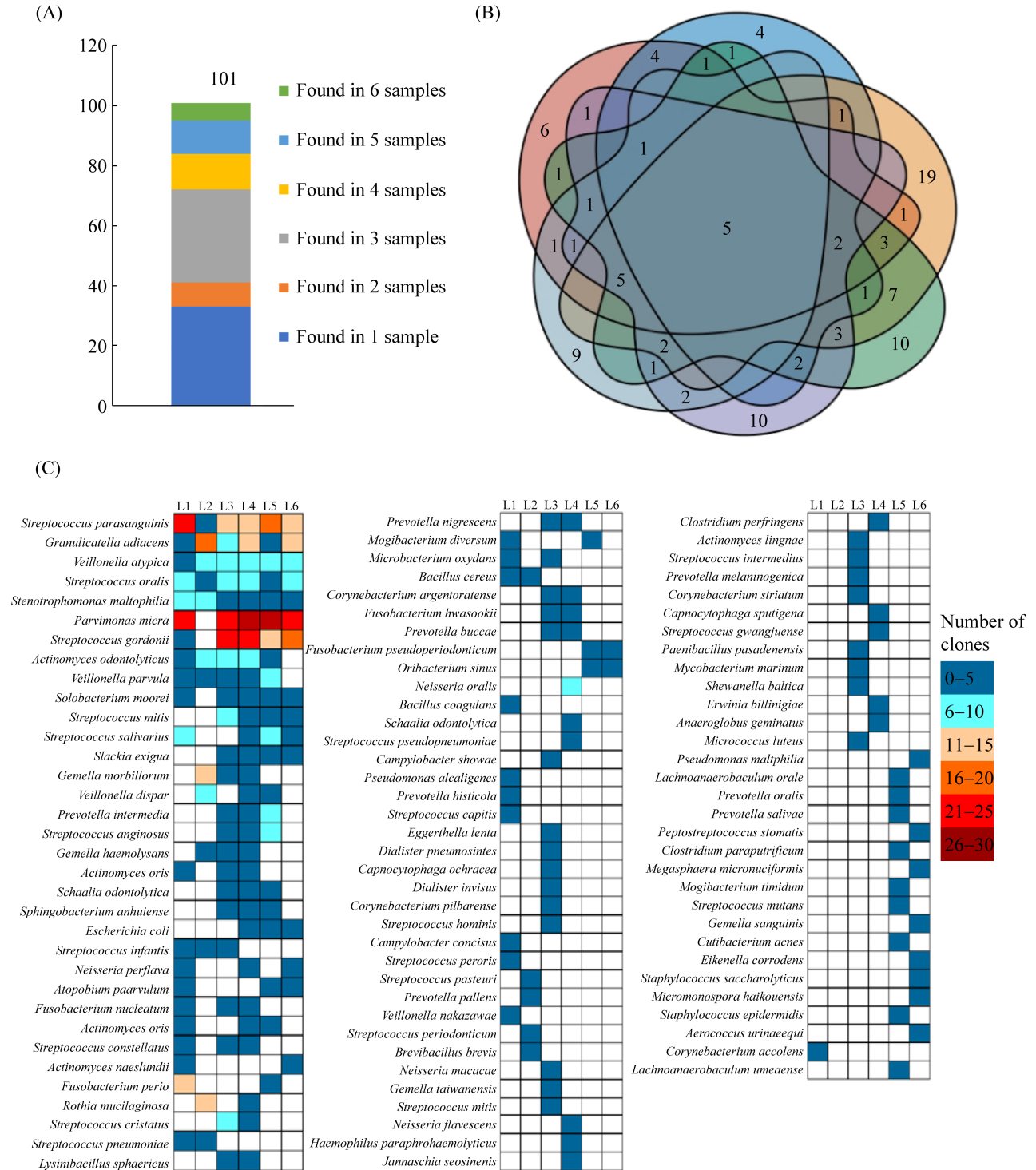


图 2 6 个样本中分离细菌总体情况

Figure 2 Isolated bacteria in 6 samples. A: the number of isolated bacteria in 6 samples; B: the Venn of isolated bacteria between different alveolar lavage fluid samples; C: the bacteria isolated from the 6 samples and their distribution in each sample.

表 1 6 个样本中分离细菌的主要门属水平组成
Table 1 The main phyla and genus level composition of bacteria isolated from the 6 samples

Category	Number of strains	Percentage/%
<i>Firmicutes</i>	51	50
<i>Streptococcus</i>	17	17
<i>Staphylococcus</i>	5	4
<i>Veillonella</i>	4	4
<i>Actinomycota</i>	21	21
<i>Actinomyces</i>	5	5
<i>Corynebacterium</i>	5	5
<i>Bacteroides</i>	10	10
<i>Prevotella</i>	8	8
<i>Proteobacteria</i>	15	15
<i>Neisseria</i>	4	4
<i>Fusobacterium</i>	4	4
<i>Clostridium</i>	4	4

示, 共有 5 个共有菌种, 分别为副血链球菌、毗邻颗粒链菌、非典型韦荣氏菌、口腔链球菌及嗜麦芽窄食单胞菌。

2.2 不同时间点分离菌种情况

图 3A 展示了 6 个样本在每个时间点分离出的菌种数量, 可以看出在第 0 天分离出的平均菌种数量最多, 但是样本间差异也最大, 这可能与灌洗液样本中的细菌丰度较低有关。随着增菌时间的延长, 样本中部分低丰度菌种得

到了扩增, 在增菌后的 5 个时间点均有细菌被分离出, 每个时间点分离出的菌种数随增菌时间延长先升高再降低。血培养瓶的增菌可提高分离的菌种总数。从分离菌种总数的曲线图(图 3B)中可以看出, 实验的前 4 个时间点, 增菌天数共 9 d, 分离的菌种总数增加速度较快, 而随增菌时间的继续延长, 达到第 15 天和第 30 天时, 分离的菌种总数增长速度缓慢甚至停滞。这是因为随着增菌时间的延长, 血瓶内营养物质被消耗、细菌的代谢废物的累积, 这时血瓶内的增菌条件可能不再适合细菌的继续生长。

2.3 不同增菌条件分离菌种情况

如图 4A 所示, 肺泡灌洗液样本在厌氧环境分离出来的菌种总数多于需氧环境。6 个样本在厌氧环境中共分离获得 70 种细菌, 在需氧环境中共分离出 47 种细菌, 其中 16 种细菌在需氧和厌氧环境中均被分离出。从两种条件分离菌种的组成来看, 在需氧条件下变形菌门和放线菌门的分离菌株多于厌氧条件, 而厚壁菌门、拟杆菌门和梭杆菌门的菌种在厌氧条件分离出较多, 其中梭杆菌门的菌种仅在厌氧环境中被分离出来。

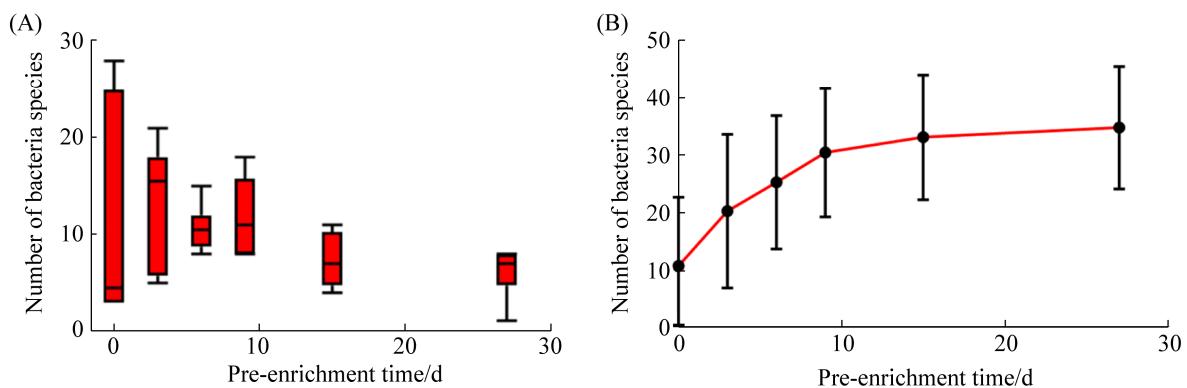


图 3 不同时间点分离细菌情况

Figure 3 Isolation of bacteria at different time points. A: the number of bacteria isolated at each time point; B: the total number of bacteria isolated at each time point.

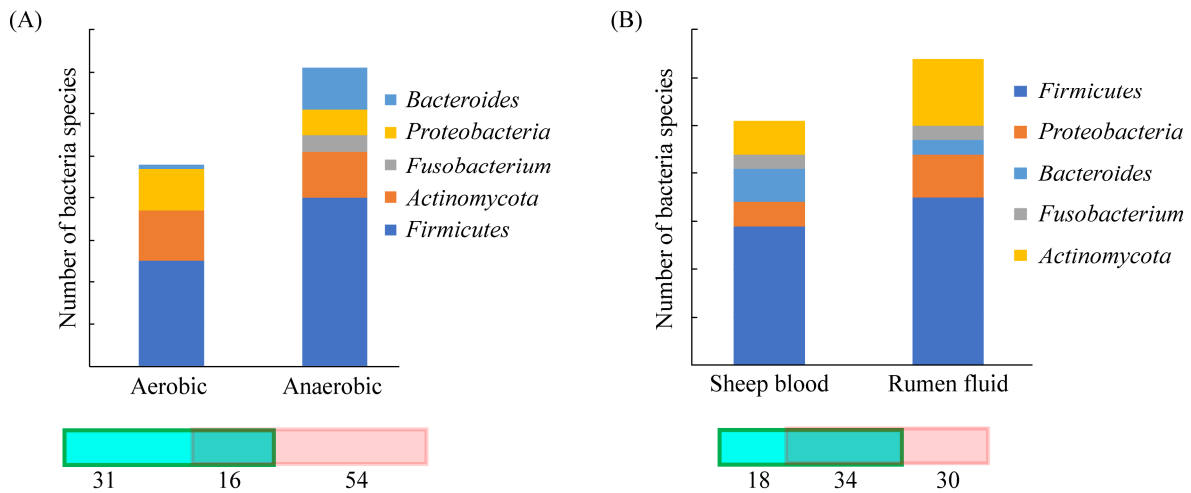


图 4 不同增菌条件下分离细菌的情况

Figure 4 Isolated bacteria under different enrichment conditions. A: the number of isolated bacteria under aerobic or anaerobic culture. The number in the middle was bacteria isolated from both conditions; B: the number of isolated bacteria from the pre-enriched blood bottle with sheep blood or rumen fluid. The number in the middle was bacteria isolated in either supplementary culture medium.

预增菌血瓶添加羊血和添加瘤胃液分离菌种差异结果如图 4B 所示, 补充瘤胃液增菌后共分离出 64 种细菌, 补充羊血增菌后共分离出 52 种细菌, 34 种细菌在补充羊血和瘤胃液的环境中均被分离出。血瓶预增菌时补充瘤胃液可比补充羊血分离出更多的菌种, 尤其是对放线菌门和变形菌门的菌种分离效果明显。由此可见, 虽然瘤胃液被广泛用于配置培养肠道微生物群的培养基, 在培养肺部微生物群时, 添加瘤胃液仍能起到很好的分离培养效果。

2.4 本次培养菌种的既往分离情况

将本次培养的 101 个菌种与已分离菌种的在线数据库进行比对(图 5), 其中 67 种细菌曾在人体肠道中被分离出, 57 种细菌曾经在人体口腔和呼吸道中被分离出, 37 种细菌曾在肠道和呼吸道中均被分离出。此外, 曾在体表和环境分离出的细菌和曾在心脏、血液和大脑中分离出的细菌也与本次培养的肺部菌种有较多的交叉。这说明肺部微生物群构成与人体其他

部位有很大的重合。此外, 从 6 个样本中培养出了 6 个潜在新菌, 其分离方法及可能的分类学地位见表 2。

3 讨论与结论

本研究利用培养组学技术对肺泡灌洗液样本进行分离培养, 所分离的菌种构成与已报道的基因测序结果基本吻合, 但在结果上培养组学能够将细菌鉴定至菌种水平, 这对二代基因测序测得的属水平进行了细化^[15]。此外通过培养我们获得了放线菌门的菌种, 这一结果对先前 Zhuo 等^[14]对肺泡灌洗液的测序结果做了补充。

通过对从不同的时间点菌种分离结果的总结发现, 在增菌前期分离出的菌种数目增加较快, 而后期平缓, 在以后的培养过程中应将培养重点放在增菌前期, 相应增加增菌前期的取样次数, 增菌后期不做重点培养, 以提高培养的效率。不同分离培养条件下培养的菌种结果

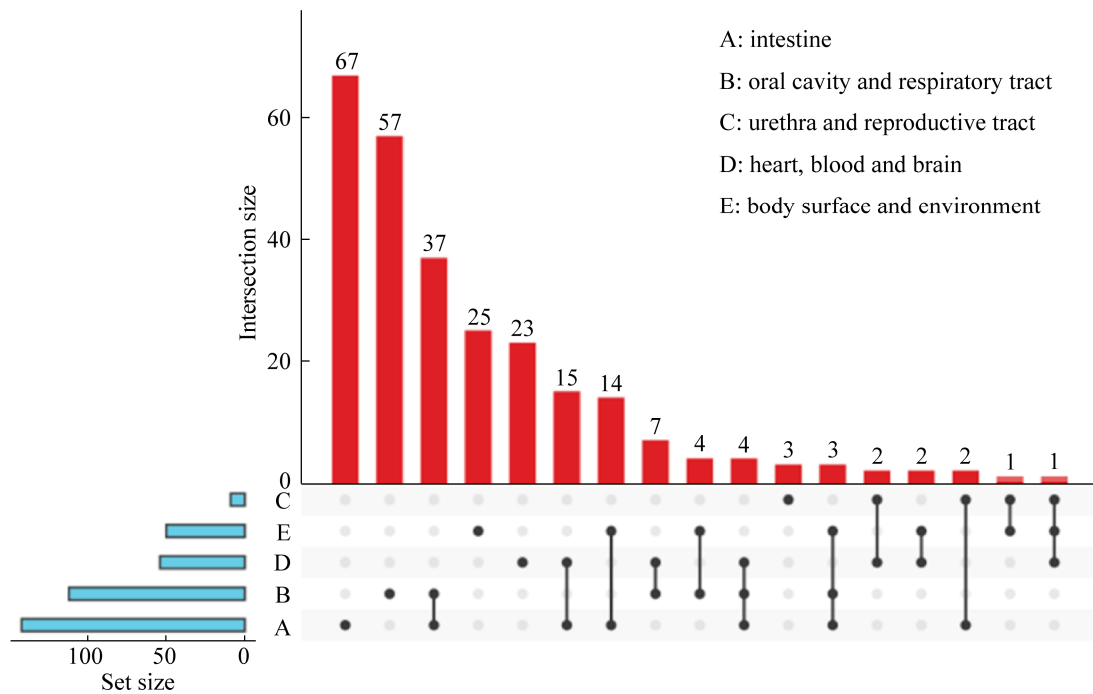


图 5 本研究中肺泡灌洗液培养菌种既往分离部位(场所)

Figure 5 The previous isolation locations of bacteria cultured in alveolar lavage fluid in this study. A: intestine; B: oral cavity and respiratory tract; C: urethra and reproductive tract; D: heart, blood and brain; E: body surface and environment.

表 2 六种潜在新菌的来源及分类学地位

Table 2 The origin and classification of the six newly isolated strains

Names	Sample sources	Groups	Closest relatives	Identity/%
Strain 1	L1	Anaerobic/Rumen fluid	<i>Selenomonas</i> sp.	96.71
Strain 2	L1	Anaerobic/Rumen fluid	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	89.13
Strain 3	L1	Anaerobic/Rumen fluid	<i>Prevotella pallens</i>	97.49
Strain 4	L1	Anaerobic/Sheep blood	<i>Bacillus coagulans</i>	97.30
Strain 5	L4	Anaerobic/Rumen fluid	<i>Shuttleworthia satelles</i>	94.48
Strain 6	L6	Aerobic/Sheep blood	<i>Paenibacillus cineris</i>	96.77

提示我们,在研究呼吸道微生物群时不能忽视存在于呼吸道中的厌氧微生物群,羊血和瘤胃液可作为培养呼吸道微生物群的营养补充剂来提高菌种分离的数目。在未来的培养中,我们有必要通过调整培养基添加剂来分离更多的细菌。

将本次分离出的菌种与其在既往报道中的分离部位进行比较可以看出肺泡灌洗液微生物群与人体其他部位(如肠道、血液等)有着

密不可分的联系^[16]。这为微生物与人体健康的联系提供了新的证据。6株潜在新菌需要进一步从进化、生理和生化等方面进行细菌鉴定,若为新的细菌种属,则是对人类微生物组菌库的补充^[17]。

综上,本研究表明需要继续使用培养组学的方法对呼吸道微生物群进行探索,并对培养条件进行优化,以期分离出更多的菌种。

参考文献

- [1] Thorpe JE, Baughman RP, Frame PT, Wesseler TA, Staneck JL. Bronchoalveolar lavage for diagnosing acute bacterial pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 1987, 155(5): 855–861.
- [2] Proctor LM. The human microbiome project in 2011 and beyond. *Cell Host & Microbe*, 2011, 10(4): 287–291.
- [3] Chung WS, Lin CL, Hsu WH, Kao CH. Increased risk of lung cancer among patients with bronchiectasis: a nationwide cohort study. *QJM: an International Journal of Medicine*, 2016, 109(1): 17–25.
- [4] Nejman D, Livvyatan I, Fuks G, Gavert N, Zwang Y, Geller LT, Rotter-Maskowitz A, Weiser R, Mallel G, Gigi E, Meltser A, Douglas GM, Kamer I, Gopalakrishnan V, Dadosh T, Levin-Zaidman S, Avnet S, Atlan T, Cooper ZA, Arora R, Cogdill AP, Khan MAW, Ologun G, Bussi Y, Weinberger A, Lotan-Pompan M, Golani O, Perry G, Rokah M, Bahar-Shany K, Rozeman EA, Blank CU, Ronai A, Shaoul R, Amit A, Dorfman T, Kremer R, Cohen ZR, Harnof S, Siegal T, Yehuda-Shnaidman E, Gal-Yam EN, Shapira H, Baldini N, Langille MGI, Ben-Nun A, Kaufman B, Nissan A, Golan T, Dadiani M, Levanon K, Bar J, Yust-Katz S, Barshack I, Peeper DS, Raz DJ, Segal E, Wargo JA, Sandbank J, Shental N, Straussman R. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science*, 2020, 368(6494): 973–980.
- [5] Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nature Reviews Immunology*, 2014, 14(12): 827–835.
- [6] Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, Martinez FJ, Huffnagle GB. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PLoS ONE*, 2011, 6(2): e16384.
- [7] Ramírez-Labrada AG, Isla D, Artal A, Arias M, Rezusta A, Pardo J, Gálvez EM. The influence of lung microbiota on lung carcinogenesis, immunity, and immunotherapy. *Trends in Cancer*, 2020, 6(2): 86–97.
- [8] 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, Mailhe M, Ricaboni D, Bilén M, Dangui Niekou NPM, Dia Badiane NM, Valles C, Mouelhi D, Diop K, Million M, Musso D, Abrahão J, Azhar EI, Bibi F, Yasir M, Diallo A, Sokhna C, Djossou F, Vitton V, Robert C, Rolain JM, La Scola B, Fournier PE, Levasseur A, Raoult D. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature Microbiology*, 2016, 1: 16203.
- [9] Lagier JC, Million M, Hugon P, Armougom F, Raoult D. Human gut microbiota: repertoire and variations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012, 2: 136.
- [10] Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(1): 237–264.
- [11] Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, Bittar F, Fournous G, Gimenez G, Maraninchi M, Trape JF, Koonin EV, La Scola B, Raoult D. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 18(12): 1185–1193.
- [12] Chang YX, Hou FY, Pan ZY, Huang ZY, Han N, Bin L, Deng HM, Li ZC, Ding L, Gao H, Zhi FC, Yang RF, Bi YJ. Optimization of culturomics strategy in human fecal samples. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2891.
- [13] Lagier JC, Dubourg G, Million M, Cadoret F, Bilén M, Fenollar F, Levasseur A, Rolain JM, Fournier PE, Raoult D. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16: 540–550.
- [14] Zhuo ML, An TT, Zhang CT, Wang ZP. Characterization of microbiota in cancerous lung and the contralateral non-cancerous lung within lung cancer patients. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 1584.
- [15] Gevers D, Knight R, Petrosino JF, Huang K, McGuire AL, Birren BW, Nelson KE, White O, Methé BA, Huttenhower C. The Human Microbiome Project: a community resource for the healthy human microbiome. *PLoS Biology*, 2012, 10(8): e1001377.
- [16] Bilén M, Dufour JC, Lagier JC, Cadoret F, Daoud Z, Dubourg G, Raoult D. The contribution of culturomics to the repertoire of isolated human bacterial and archaeal species. *Microbiome*, 2018, 6(1): 94.
- [17] Pfliegerer A, Lagier JC, Armougom F, Robert C, Vialettes B, Raoult D. Culturomics identified 11 new bacterial species from a single anorexia nervosa stool sample. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2013, 32(11): 1471–1481.

(本文责编 李磊)