

南极乔治王岛冰锥洞微生物培养探索

毛梦婷^{1,2}, 张瑾², 文皎², 陈波², 廖丽^{2,3*}

1 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306

2 中国极地研究中心 自然资源部极地科学重点实验室, 上海 200136

3 上海交通大学海洋学院, 上海 200240

毛梦婷, 张瑾, 文皎, 陈波, 廖丽. 南极乔治王岛冰锥洞微生物培养探索[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2066-2077.

MAO Mengting, ZHANG Jin, WEN Jiao, CHEN Bo, LIAO Li. Cultivation of microbes in habitat of cryoconite at King George Island of Antarctica[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(6): 2066-2077.

摘要:【目的】南极洲具备独特的环境和相对的生物地理隔离, 南极洲各类生境中蕴藏了大量尚未培养和难培养的微生物, 也是新颖微生物物种的重要来源之一。本研究以南极冰锥洞这类特殊生境为研究对象, 通过培养条件的多样化提升南极微生物的培养率和多样性, 揭示南极冰锥洞可培养微生物类群多样性, 为该环境可培养微生物功能研究奠定基础, 也为南极极端环境未培养微生物的培养方法提供借鉴。【方法】通过采用不同培养基添加复苏促进因子(resuscitation promoting factor, Rpf)的方式, 提高南极柯林斯冰盖冰锥洞生境中微生物的可培养率, 探究该生境中微生物的多样性。采用4种不同营养水平的培养基, 平行添加Rpf进行菌株培养, 经分离纯化与16S rRNA基因鉴定, 分析冰锥洞可培养微生物的多样性及培养条件对多样性的影响。【结果】本研究共分离培养细菌407株, 涵盖5个门、18个科、29个属, 其中: 放线菌门(*Actinomycetota*)为优势门, 占72.73%; 微杆菌科(*Microbacteriaceae*)为优势科, 占69.78%; *Lacisediminihabitans*属为优势属, 占45.70%。从培养基效果分析, 培养出菌株数从多到少依次为: R2A培养基(188株)>1/2 R2A+Rpf培养基(144株)>1/2 R2A培养基(46株)>R2A+Rpf培养基(14株)>TSB+Rpf培养基(9株)>TSB培养基(3株)=LB培养基(3株)。而LB+Rpf培养基未培养出微生物。按照文献建议的16S rRNA基因序列相似性98.65%以下为潜在新种依据, 分离得到的菌株中共有69株为潜在新菌, 涵盖19个潜在新种, 分离潜在新种率较高的培养基为R2A培养基、1/2 R2A培养基以及1/2 R2A+Rpf培养基。【结论】本研究共采用8种不同的培养基组合, 从南极冰锥洞样品中获得了一定量的可培养细菌, 提示了不同培养基添加复苏促进因子对菌株生长的促进作用, 并获得多个潜在新种。分离获得的菌株具有较高的多样性, 为今后利用不同培养基策略分离极地特殊环境未培养微生物带来启发。

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2807501)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2807501).

*Corresponding author. E-mail: liaoli@pric.org.cn

Received: 2023-02-19; Accepted: 2023-05-24

关键词: 南极; 冰锥洞; 微生物多样性; 16S rRNA; 培养基组合

Cultivation of microbes in habitat of cryoconite at King George Island of Antarctica

MAO Mengting^{1,2}, ZHANG Jin², WEN Jiao², CHEN Bo², LIAO Li^{2,3*}

1 College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Key Laboratory for Polar Science, Ministry of Natural Resources, Polar Research Institute of China, Shanghai 200136, China

3 School of Oceanography, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] Antarctica is a unique habitat harboring diverse microorganisms because of its extreme environmental conditions. The aim of this study is to promote the growth of microorganisms that are difficult to culture by changing the culture conditions to isolate lesser-known microorganisms. This study provides a better understanding of the unique microbial groups and their diversity in Antarctic cryoconites and provides guidance for the development of culture methods for uncultured microorganisms in the extreme environments of Antarctica. [Methods] We added resuscitation-promoting factor (Rpf) in different media to improve the culture efficiency of microorganisms from the cryoconite of the Collins Glacier, Antarctica, and explore the diversity of microorganisms in this habitat. Four media with different nutrient levels were used for strain culture, and Rpf was added in parallels. After isolation, purification, and 16S rRNA sequencing, the diversity of culturable microorganisms in the cryoconite and the influence of culture conditions on the diversity were analyzed. [Results] A total of 407 bacterial strains were isolated and cultured, covering 29 genera, 18 families of 5 phyla. *Actinomycetota*, *Microbacteriaceae*, and *Lacisediminihabitans* were the dominant phylum, family, and genus with the relative abundance of 72.73%, 69.78%, and 45.70%, respectively. According to the number of strains cultured, different media followed the trend of R2A medium (188 strains) > 1/2 R2A+Rpf medium (144 strains) > 1/2 R2A medium (46 strains) > R2A+Rpf medium (14 strains) > TSB+Rpf medium (9 strains) > TSB medium (3 strains) = LB medium (3 strains). No microorganism was cultured in LB+Rpf medium. According to the threshold of 16S rRNA sequence similarity below 98.65%, which indicates potential new species, 69 out of the isolated strains belonged to 19 potential new species. The media with high isolation rates of potential new species were R2A, 1/2 R2A, and 1/2 R2A+Rpf. [Conclusion] Eight different media were used to recover bacteria from the Antarctic cryoconite samples, and the addition of Rpf can generally promote the growth of strains. A relatively diverse collection of strains including several putative novel species has been isolated, which inspires the future use of different media for the isolation of microorganisms difficult to culture in extreme polar environments.

Keywords: Antarctic; cryoconite; microbial diversity; 16S rRNA; medium combination

南极洲是世界上海拔最高的大陆,具有高纬度、高辐射、强风、干燥和极寒等特点。南极洲98%的面积被冰雪覆盖,其中冰盖的平均高度有2 000多m(占全球淡水资源的70%),仅在夏季(11月到3月)露出沿岸地带和冰盖边缘^[1]。尽管南极具备如此极端的气候和环境特征,南极各生境中仍然生活着丰富多样的微生物^[2-3],因此南极不仅是研究生命耐受之极、生命起源和进化的绝佳天然实验室,也是分离培养新颖极端微生物资源的重要来源。

在南极冰川表面有一种特殊的生态环境被称为冰锥洞,也叫冰锥石、冰尘穴或冰尘洞(cryoconite),是由低反照率颗粒物沉降在冰川表面融化而成的凹陷。这些沉积物组分类似于地表土壤,但是由大范围风场作用迁移而来,通常包含远距离输送的尘埃和气溶胶等,也有本地来源的各种碎屑和颗粒物^[4-5]。冰锥洞承载着活跃的微生物群落和生物地球化学循环^[6],是冰川表面微生物活动的热点生境。早在2003年,Christner等^[7]就对南极冰锥洞的细菌和真核生物做了分子生物学鉴定,确定其主要来自于相邻湖冰中,他们推断该类生境可以作为生物避难所,因而冰锥洞生境具备微生物学、生物地球化学和生态学研究的重要性,成为研究南极冰表微生物群落形成、集合和功能的小尺度自然生态系。

极地微生物在地球物质循环及能量流动中扮演着重要的角色,发挥储存物质能量的作用^[8],同时在它们的细胞内也存在着一些尚未被发现的潜在新型生物活性物质。因此针对极地环境中的微生物开展其多样性的研究更有利于微生物资源的开发和利用。近年来,随着高通量测序技术、宏基因组学等技术的快速发展,研究者们可以在基因水平解析微生物群体多样性,并对一些未培养或难培养微生物的代谢产物进行推

测分析^[9]。但基于非培养的技术局限性也很明显,无法从中获取可培养的菌株,致使研究者们无法准确了解其外在形态、生理代谢特性、生态功能等,且分子生物学方法产生的数据如果缺乏基本的生理学实验数据支撑难以被解释。

微生物培养组学为未培养和难培养微生物的培养提供了可能的解决方法和思路。据称,自然环境中有99%以上的微生物处于活的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态^[10],这一类微生物通常都在休眠状态,靠极低的代谢活动提供生存所必需的物质和能量。限制培养的因素主要有以下几种:原位环境难以复刻、培养基的富营养化、微生物间的互作关系被破坏以及绝大多数微生物物种丰度低、生长速度慢等^[11]。因此改变培养基或设置新型培养基组合,发展微生物培养组学以提高环境中微生物的可培养率,成为微生物研究中的一项重要任务,是后续开展生理代谢和功能等研究的基础,也是微生物及其产物资源开发的前提。

近年来多数研究者通过改变培养基组分或通过不同培养基组合的方式^[12],提高了可培养微生物的多样性,获得了很多新的微生物种群。Nichols等^[13]通过在普通培养基中添加5个氨基酸的短肽LQPEV,从海洋砂坪中分离得到了MSC33类型的未培养细菌。岳秀娟等^[14]在培养基中加入甜菜碱、丙酮酸钠或过氧化氢酶等化合物,使从土壤中分离到的微生物种类及菌落总数明显增加。Connon等^[15]采用高通量培养法对贫营养细菌进行培养和计数,使微生物可培养性较常规培养法高出1.4–120.0倍,并从海水分离到多株未培养的浮游细菌。这些研究的成功为之后合理设计培养条件得到更多未培养微生物提供了可借鉴的方法。

本研究采用了涵盖富营养、寡营养的4种普通培养基平行加入藤黄微球菌复苏促进因子

(resuscitation promoting factor, Rpf)活性蛋白共 8 种培养基,旨在促进提升微生物可培养性。Rpf 活性蛋白是由藤黄微球菌在对数期后期分泌的一种使自身从 VBNC 状态复苏的因子^[16-17],其还能使部分处于 VBNC 状态的近缘高 GC 革兰氏阳性杆菌等菌种复苏生长^[18]。本研究展示了在不同营养条件下培养的南极乔治王岛冰川表面冰锥洞微生物的多样性。这一结果为优化多培养基组合,提高南极冰锥洞生境微生物的可培养性提供参考依据,同时也为可能存在的潜在新种研究提供了菌株资源,为进一步了解该特殊环境中可培养微生物多样性提供数据基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 采样点选择

乔治王岛(King George Island)是西南极南设得兰群岛最大的岛屿,位于 62°23'S, 58°27'W。柯林斯冰盖位于乔治王岛上,其面积约 1 250 km²,平均厚度约 2 000 m。在柯林斯冰盖上存在大量天然形成的冰锥洞,选取其中一处冰雪覆盖层较厚的地点作为本次研究的样品采集点。

1.1.2 样品处理和培养基选择

使用无菌铲将表面冰雪覆盖层刮去,取大约 50 g 冰锥洞样品,存于无菌密封袋中,-80 °C 保存,运输回国内实验室进行菌株分离培养。

设计富营养和寡营养两类培养基。富营养培养基主要是:胰酪大豆胨液体培养基(TSB 培养基)和肉汤培养基(lysogeny broth 培养基, LB 培养基),这 2 种培养基的营养成分丰富,可以给微生物提供丰富的营养物质,供给它们分解消耗;寡营养培养基是:R2A 琼脂培养基(酵母浸出粉 0.5 g,蛋白胨 0.5 g,酪蛋白水解物 0.5 g,葡萄糖 0.5 g,可溶性淀粉 0.5 g,磷酸氢二钾 0.3 g,无水硫酸镁 0.024 g,丙酮酸钠 0.3 g,添加 ddH₂O

至 1 L),其中可溶性淀粉能够吸附细菌有毒的代谢副产物,丙酮酸钠的抗氧化作用有利于受损微生物的修复。在 R2A 培养基基础上将用量减半(1/2 R2A 培养基)进一步减少培养基中营养物质的含量。平行加入含 Rpf 活性蛋白的藤黄微球菌发酵液到上述 4 种培养基中,共设计了 8 种培养基。藤黄微球菌发酵液经 0.22 μm 针孔过滤器过滤后以 1:10 的比例加入到培养基中。

1.2 菌株分离纯化

-80 °C 样品冰上融化,取出 5 g 到 50 mL 离心管中,加入无菌水至 20 mL,振荡混匀,冰浴超声 30 min,再次振荡 10 min,静置 30 min。取上清进行不同浓度梯度(1:10、1:50、1:100)稀释,与未稀释上清一起涂布于设置的培养基上,15 °C 培养。平板上生长出的菌落进一步划线分离纯化,直到长出单一形态菌落。挑取单菌落于加入相应液体培养基的试管中进行后续培养,用于菌液 PCR 和菌种保藏。

1.3 菌种鉴定

对于上述操作得到的菌株进行物种鉴定,以菌株基因组 DNA 为模板对 16S rRNA 基因序列进行体外扩增。具体步骤如下:使用试剂盒(TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0)对已经活化的菌株提取基因组 DNA,随后进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增^[19]。上、下游引物分别为 27F:5'-AGAGTTT GATCMTGGC TCAG-3', 1492R:5'-GGTTACCT TGTTACGACT T-3'。将 1 500 bp 的 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。采用 Chromas 软件分析测序结果,去除质量不佳的测序碱基后,将拼接后约 1 350 bp 长度的序列在 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)数据库中进行序列比对。参考 Kim 等^[20]基于基因组平均核苷酸相似性(average nucleotide similarity, ANI)进行物种分类的研究,发现 95%左右的 ANI

值对应 16S rRNA 相似性为 98.65%，可以作为潜在新种的判断标准。因此比对结果若相似度大于 98.65%，则认为该菌株与其最相近菌株是同种；若相似度小于等于 98.65%，则认为该菌株为潜在新种。

1.4 菌株系统发育分析

基于 EzBioCloud 数据库比对结果，下载数据库中分离菌株最相似的标准菌 16S rRNA 基因序列，将所有分离菌株及其最相近标准菌的 16S rRNA 基因序列整合到 FASTA 文件中用于后续进化分析。将 FASTA 数据导入 MEGA X 软件中用邻接法设置运算次数为 1 000 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 菌株多样性分析

本研究共分离纯化细菌 407 株，上述培养基分别分离得到的菌株个数以及潜在的菌种数见表 1。

经 16S rRNA 基因序列鉴定及系统发育分析，这 407 株菌株分属于 5 个门，18 个科，29 个属。门水平上，放线菌门(*Actinomycetota*)占总数的

72.73%，其次是变形菌门(*Proteobacteria*)占总数的 23.10%，厚壁菌门(*Firmicutes*)占总数的 1.97%，拟杆菌门(*Bacteroidota*)占总数的 1.47%，异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)占总数的 0.74%(图 1A)。科水平上，共培养了 18 个科，数量最多的 3 个科分别是微杆菌科(*Microbacteriaceae*)，丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*)和微球菌科(*Micrococcaceae*)，共占总数的 58%(图 1B)。属水平上，共培养了 29 个属，冷杆菌属(*Cryobacterium*)和 *Lacisediminihabitans* 属占主要地位，每个属所占比例都在 15%以上。其中 *Lacisediminihabitans* 属占比最高，约占总数的 46%。以下几个属仅各分离获得了一株菌：*Hymenobacter* 属、*Janibacter* 属、*Paracoccus* 属、*Pseudarthrobacter* 属、*Roseomonas* 属和 *Haematobacter* 属(图 1C)。以上结果证明，本研究冰锥洞样品中可培养的微生物具有较高的多样性。

2.2 不同培养基分离得到的微生物多样性比较

本研究 8 种培养基所分离出的菌中，不同培养基的优势种群不尽相同。以属水平举例：R2A 培养基的优势属是 *Lacisediminihabitans* 属，1/2 R2A 培养基的优势属是 *Cryobacterium* 属和 *Sphingomonas* 属，TSB 培养基只分离出一个属 *Parafrigoribacterium* 属，LB 培养基中没有比较明显的优势属，R2A+Rpf 培养基的优势属是 *Polaromonas* 属，1/2 R2A+Rpf 培养基中的优势属是 *Lacisediminihabitans* 属，TSB+Rpf 培养基中的优势属是 *Parafrigoribacterium* 属。其中 LB+Rpf 培养基未分离到菌株(图 2)。

分离得到的菌株数量由高到低的顺序是：R2A 培养基(188 株)，1/2 R2A+Rpf 培养基(144 株)，1/2 R2A 培养基(46 株)，R2A+Rpf 培养基(14 株)，TSB+Rpf 培养基(9 株)，TSB 培养基(3 株)，LB 培养基(3 株)，LB+Rpf (0 株)(表 1)。

表 1 不同培养基分离的菌株

Table 1 Strains isolated from different media		
Medium	Number of strains	Number of strains belonging to potential novel species*
R2A	188	25
R2A+Rpf	14	9
1/2R2A	46	14
1/2R2A+Rpf	144	10
TSB	3	1
TSB+Rpf	9	6
LB	3	3
LB+Rpf	0	0

*: The classification criterion of potential novel species was that the 16S rRNA gene similarity of its most similar species was less than 98.65%.

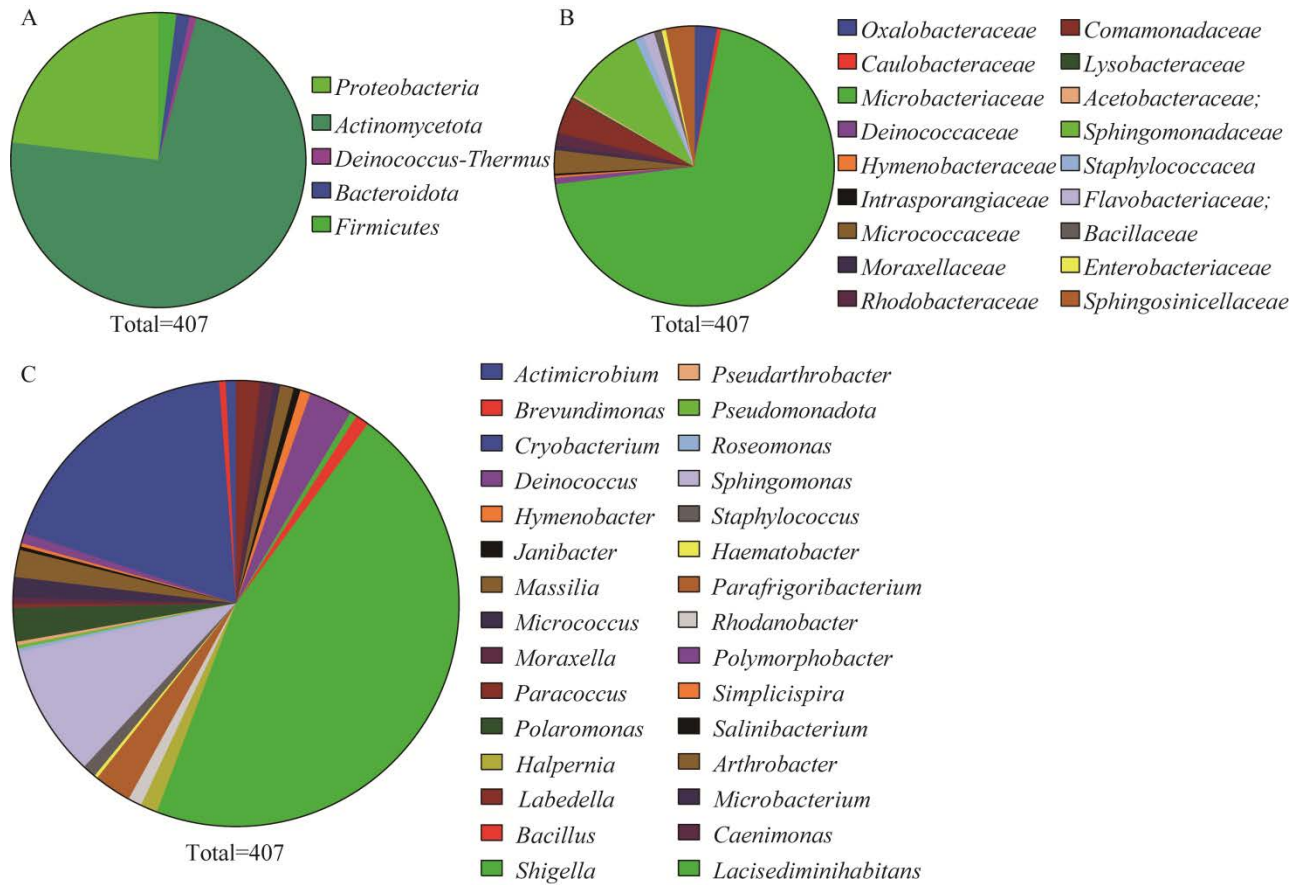


图 1 冰锥洞可培养细菌群落组成

Figure 1 Composition of culturable bacterial community in the cryoconite. Community composition at the levels of phylum, family, and genus is depicted in A, B and C, respectively.

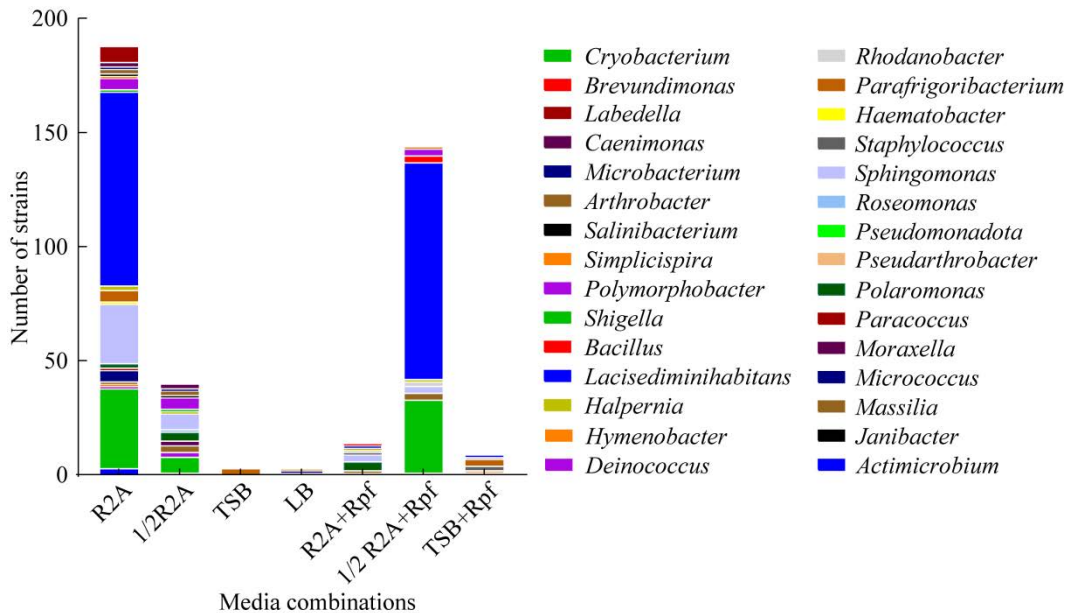
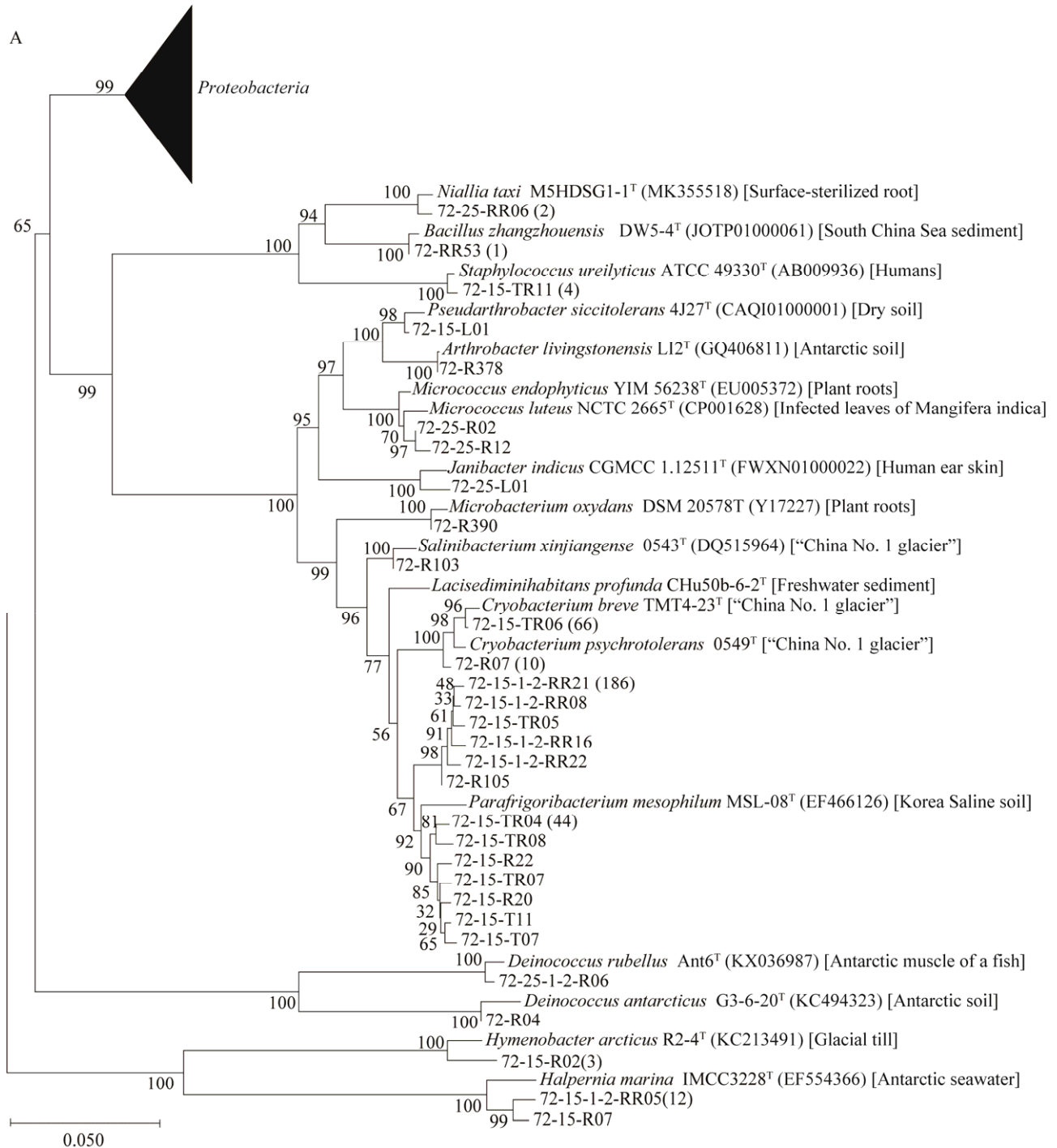


图 2 不同培养基分离得到的微生物属水平群落结构

Figure 2 The distribution of genera isolated by using different media.

可以看出 R2A 培养基和 1/2 R2A+Rpf 培养基分离得到的细菌明显多于其他培养基(图 2)。LB 培养基和 TSB 培养基只各培养出 3 株, 其中 TSB 培养基中培养到的 3 株菌都来自同一个属(*Parafrigoribacterium*)。R2A 培养基中分离出的

Lacisediminihabitans 属的细菌最多, 其余各属的分布比较少且均匀。其中一些培养基能分离出其他培养基分离不到的属, 如 LB 培养基中分离出的 3 个属(*Janibacter*、*Pseudarthrobacter*、*Micrococcus*)未在其他培养基分离得到。



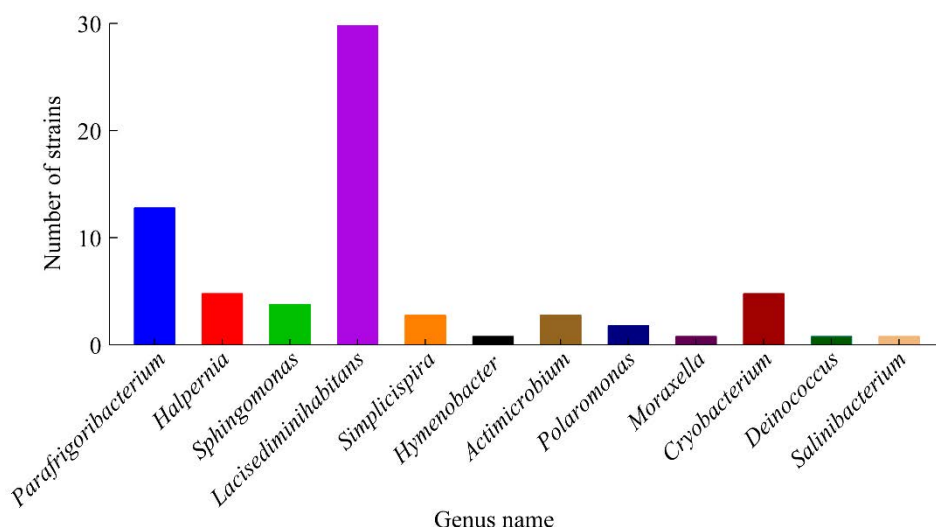


图 4 潜在新种菌株数

Figure 4 Number of strains belonging to potential novel species.

菌门 11 株, 拟杆菌门 5 株以及异常球菌-栖热菌门 1 株。另外对最相似的标准菌株分离所在环境研究后发现, 这些菌株主要分离自各种土壤、冰川的冰芯、海水以及人体和动物临床标本等多种环境, 而非来自冰锥洞生境。其中以非极地环境来源的为主(共 34 种), 部分来自极地环境(共 6 种)、人体和动物临床标本(共 6 种)。

按照培养基划分, 69 株潜在新种有 44 株分离自 R2A 培养基, 8 株分离自 1/2 R2A 培养基, 7 株分离自 1/2 R2A+Rpf 培养基, 4 株分离自 R2A+Rpf 培养基, 3 株分离自 TSB 培养基, 3 株分离自 TSB+Rpf 培养基。新菌率最高的是 R2A 培养基(12.29%), 其次是 1/2 R2A 培养基(1.97%), 最低的是 TSB 培养基和 TSB+Rpf 培养基(0.73%)。

3 讨论与结论

冰锥洞生境中的微生物来源比较多样且复杂, Millar 等^[21]对来自北极和南极共 15 个地点的冰锥洞生境中的生物群落进行调查, 在对其进行 16S 和 18S rRNA 序列分析后得到约 24 个细菌门和 11 个真核生物门, 并发现南极冰锥洞生

境中微生物种群较北极更为丰富。另外 Poniecka 等^[22]对来自南极洲、格陵兰岛和斯瓦尔巴群岛 3 个地方的共 9 个地点冰锥洞生境的样品中的生物群落进行调查, 通过分离培养的方法成功得到了 44 株菌株, 其中从南极样品中分得的有 10 种不同的细菌, 并发现分离得到的菌株大多数与放线菌有关(79%), 其次是拟杆菌(18%)和变形杆菌(3%)。本研究所得菌株大多数也属于放线菌, 与其结果相似。Poniecka 等^[22]在南极样品中分离得到的 *Cryobacterium* 属和 *Actimicrobium* 属的菌株, 在本研究中也分离得到。

本研究采用 8 种培养基, 完成了 407 株菌的分离和鉴定, 获得涵盖 5 个门, 18 个科, 29 个属的可培养菌株, 且可能存在 69 个代表 12 个潜在新种的菌株, 分离获得的菌株数量和新颖性远超过只使用单一培养基。其中放线菌门是最主要的微生物类群, 而厚壁菌门、拟杆菌门和异常球菌-栖热菌门则占比较低。根据先前的研究, 在南极地区微生物的主要优势种大多来自变形菌门和拟杆菌门^[23], Poniecka 等^[22]的实验中提到冰锥洞生境中的主要优势种为放线菌门, 说明冰

锥洞生境中的优势类群与南极地区其他环境中的优势类群不完全一致。本次研究站点分离出的优势种大多来自放线菌门, 与 Poniecka 等^[22]的实验结果相一致, 且 *Lacisediminihabitans* 属的含量最高。该属自 2019 年于韩国水库沉积物中首次被分离发现^[24], 随后 2021 年^[25]在南极长城站附近的沼泽地泥中也被分离到该属的一株新种。本研究获得多个菌株均与该属有较高 16S rRNA 基因序列相似性(98.65%), 但可能不同于已经鉴定的 2 个种, 意味着这个属可能在南极低温环境中适应能力很好, 且可能进一步经历了物种分化。此外, 从最相似的标准菌株来源环境分析, 本研究获得的菌株绝大多数跟来自非极地环境的标准菌株具有较高相似性, 意味着有两种可能性: 第一种, 这些类群的微生物属于全球分布的物种(cosmopolitan taxa), 因此不存在显著的地域差异; 第二种, 这些类群是由风等大气运动从非极地环境搬运到南极冰川表面, 跟冰锥洞的形成是吻合的。

与原位环境更相近的寡营养培养基, 更容易分离得到一些可培养但未培养的微生物种群。本研究所用的 R2A 培养基及 1/2 R2A 培养基与 LB 培养基、TSB 培养基相比, 不同程度减少了培养基中的营养物质含量。在本研究中, Rpf 在 TSB 这种富营养培养基中, 有较好地提高菌株多样性和获得菌株数量的作用, 但在 R2A 这种寡营养条件下并没有显著作用, 说明 Rpf 活性因子在特定条件下可以激活细胞 VBNC 状态, 使其复苏。极地极端环境属于典型的寡营养环境, 在培养过程中, 一些竞争力小、丰度低的微生物种群在营养物质丰富的环境中往往被压制。针对这类微生物, 一般会通过样品稀释或培养基营养成分稀释来解决^[26]。本研究中 R2A 培养基和 1/2 R2A 培养基相较于 TSB 培养基和 LB 培养基属于寡营养培养基, 但分离出的菌数量却更多, 说

明该生境下的微生物更偏好于寡营养的环境。可见, 营养条件对于获得更多的可培养菌十分重要, 以往利用富营养培养基这种单一的培养条件可能会使极地可培养细菌的多样性被大大低估。因此, 在分离极地环境样品中的微生物时, 降低培养基中的营养物质含量, 有利于得到更为丰富和新型的菌株资源^[27]。本研究采取贫营养培养基并添加 Rpf 的策略, 得到了此前并未在冰锥洞生境分离得到的菌株。

微生物的 VBNC 状态是可复苏的, 但对于这一状态的研究主要集中在流行病医学领域, 对于环境微生物的研究相对较少^[28]。在极端环境中, 很多微生物为了能够存活下去, 会利用自身保护机制使自身处于休眠状态, 复苏这一类微生物需要在培养基中加入一些活性因子, 最常见的方式就是加入藤黄微球菌 Rpf 活性蛋白^[29]。本研究中, Rpf 的加入对于富营养培养基 TSB 的促进作用是非常明显的, 未加入 Rpf 的 TSB 培养基分离出的菌株有 3 株, 潜在新种有 1 种, 但在加入 Rpf 后分离菌株有 9 株, 潜在新种有 6 株。另外加入 Rpf 的培养基中能够分离得到普通培养基中无法分离得到的菌株。例如 *Rhodanobacter* 属只在加入 Rpf 的培养基中分离得到。由此可见, 添加该类复苏因子可以培养得到常规培养方式下得不到的微生物种类。

本研究通过不同的培养基及添加活性因子等方式, 分离出一些常规培养方式无法分离得到的微生物种类, 为后续培养“微生物暗物质^[30]”提供了借鉴思路和方法, 后续可以通过设置更多的培养温度或改变分离时的上清稀释浓度等条件获得更丰富的微生物种类。在未来的研究中可以将高通量培养技术与传统的培养技术相结合, 达到获得更多新菌种的目的。同时, 对未培养微生物培养结果的分析可以指导和改进纯培养的方法和技术, 设计针对性的分离方案, 富集培养

策略和检测技术,形成一系列模型化的增菌培养方法,形成多类型的“增菌培养基”^[31],获得更多的可培养极地微生物,为深入研究微生物多样性、起源和进化^[32]、生理生态学等提供新理念和机遇。

参考文献

- [1] 马红梅, 闫文凯, 程永前, 张宇, 肖湘, 史贵涛, 孙波, 李院生. 极地冰川底部微生物多样性及对气候变化的响应研究概况及其前景[J]. 极地研究, 2016.29(1): 1-10.
MA HM, YAN WK, CHENG YQ, ZHANG Y, XIAO X, SHI GT, SUN B, LI YS. Progress of diversity of subglacial ecosystem and their response to the climate change[J]. Chinese Journal of Polar Research, 2016, 29(1): 1-10 (in Chinese).
- [2] LAMBRECHTS S, WILLEMS A, TAHON G. Uncovering the uncultivated majority in Antarctic soils: toward a synergistic approach[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 242.
- [3] CAVICCHIOLI R. Erratum: microbial ecology of Antarctic aquatic systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(12): 795.
- [4] WHARTON RA JR, MCKAY CP, SIMMONS GM JR, PARKER BC. Cryoconite holes on glaciers[J]. *BioScience*, 1985, 35(8): 499-503.
- [5] MACDONELL S, FITZSIMONS S. The formation and hydrological significance of cryoconite holes[J]. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*, 2008, 32(6): 595-610.
- [6] FOREMAN CM, SATTler B, MIKUCKI JA, PORAZINSKA DL, PRISCU JC. Metabolic activity and diversity of cryoconites in the Taylor Valley, Antarctica[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2007, 112(G4): S32.
- [7] CHRISTNER BC, REEVE JN. Molecular identification of bacteria and eukarya inhabiting an Antarctic cryoconite hole[J]. *Extremophiles*, 2003, 7(3): 177-183.
- [8] STACKEBRANDT E, EMBLEY TM. Diversity of uncultured microorganisms in the environment[M]// *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Boston, MA: Springer US, 2000: 57-75.
- [9] KALAM S, BASU A, PODILE AR. Difficult-to-culture bacteria in the rhizosphere: the underexplored signature microbial groups[J]. *Pedosphere*, 2022, 32(1): 75-89.
- [10] 骆祝华, 黄翔玲, 王琳, 裴耀文, 叶德赞. 海洋细菌抑菌活性菌株的筛选[J]. 台湾海峡, 2002(2):181-186.
LUO ZH, HUANG XL, WANG L, PEI YW, YE DZ. Screening of marine bacteria with antimicrobial activity[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2002(2):181-186 (in Chinese).
- [11] 熊盈盈, 莫祯妮, 邱树毅, 曾祥勇. 未培养环境微生物培养方法的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(5): 1765-1779.
XIONG YY, MO ZN, QIU SY, ZENG XY. Research progress on culture methods of uncultured environmental microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(5): 1765-1779 (in Chinese).
- [12] 胡元森, 李翠香, 孙富林, 吴坤, 贾新成. 不同培养基组合提高土壤细菌可培养性的研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(5): 882-887.
HU YS, LI CX, SUN FL, WU K, JIA XC. Improved culturability of soil bacteria using proper combination with various culturing medium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(5): 882-887 (in Chinese).
- [13] 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.
- [14] 岳秀娟, 余利岩, 李秋萍, 魏玉珍, 关艳, 张月琴. 自然界中难分离培养微生物的分离和应用[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 77-81.
YUE XJ, YU LY, LI QP, WEI YZ, GUAN Y, ZHANG YQ. Study of methods to isolate viable but non-culturable microorganisms from natural environments[J]. *Microbiology*, 2006, 33(3): 77-81 (in Chinese).
- [15] CONNON SA, GIOVANNONI SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3878-3885.
- [16] 罗旦. 红平红球菌 Rpf 基因突变、生物活性及应用研究[D]. 兰州: 兰州理工大学硕士学位论文, 2019.
LUO D. Studies on Rpf Gene Mutation and Biological Characterization of *Rhodococcus erythropolis* and its Application[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [17] 巩徐. 红树林来源产复苏促进因子放线菌筛选、基因异源表达与活性研究[D]. 南宁: 广西民族大学硕士学位论文, 2022.
GONG X. Screening, heterologous expression and activity of actinomycetes producing recovery promoting factors from mangroves[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University for Nationalities, 2022 (in Chinese).

- [18] 丁林贤, 张萍华, 洪华嫦, 林红军, 横田明. 藤黄微球菌 Rpf 活性蛋白的制取及其对红球菌 VBNC 菌体的复苏作用[J]. 微生物学报, 2012, 52(1): 77-82.
DING LX, ZHANG PH, HONG HC, LIN HJ, HENG TM. Cloning and expression of *Micrococcus luteus* IAM 14879 Rpf and its role in the recovery of the VBNC state in *Rhodococcus* sp. DS471[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(1): 77-82 (in Chinese).
- [19] 刘庆, 辛玉华, 东秀珠. 基于 16s rRNA 基因和基因组序列对细菌物种的初步鉴定[J]. Bio-101 e2003932. 2021.01.
LIN Q, XIN YH, DONG XZ. Preliminary identification of bacterial species based on 16S rRNA gene and genomic sequence[J]. Bio-101 e2003932. 2021.01 (in Chinese).
- [20] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt_5): 1825.
- [21] MILLAR JL, BAGSHAW EA, EDWARDS A, PONIECKA EA, JUNGBLUT AD. Polar cryoconite associated microbiota is dominated by hemispheric specialist genera[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 738451.
- [22] PONIECKA EA, BAGSHAW EA, SASS H, SEGAR A, WEBSTER G, WILLIAMSON C, ANESIO AM, TRANTER M. Physiological capabilities of cryoconite hole microorganisms[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1783.
- [23] 张义和. 南极长城湾海洋沉积物及潮间带微生物的群落结构及宏基因组学研究[D]. 烟台: 烟台大学硕士学位论文, 2020.
ZHANG YH. Study on microbial community structure and metagenomics in marine sediments and intertidal zone of Great Wall Bay, Antarctica[D]. Yantai: Master's Thesis of Yantai University, 2020 (in Chinese).
- [24] ZHUO Y, JIN CZ, JIN FJ, LI TH, KANG DH, OH HM, LEE HG, JIN L. *Lacisediminihabitans profunda* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Microbacteriaceae* isolated from freshwater sediment[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2020, 113(3): 365-375.
- [25] LIANG YZ, JIANG PQ, YAO BQ, JIAO YB, LI J. *Lacisediminihabitans changchengi* sp. nov., an actinobacterium isolated from Antarctic swamplands mud[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(9): 5519-5524.
- [26] 卢婧雯, 张心齐, 杜丽丽, 杨志坚, 吴敏, 卢龙斗. 中国东海及南海近海 4 采样点海水可培养细菌的多样性研究[J]. 浙江大学学报(理学版), 2012, 39(4): 443-449.
LU JW, ZHANG XQ, DU LL, YANG ZJ, WU M, LU LD. Bacterial isolation and diversity analysis of four seawater sampling sites of the east China Sea and the south China Sea[J]. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2012, 39(4): 443-449 (in Chinese).
- [27] 张硕, 丁林贤, 苏晓梅. 微生物 VBNC 状态形成及复苏机制[J]. 微生物学报, 2018, 58(8): 1331-1339.
ZHANG S, DING LX, SU XM. Formation and resuscitation of the viable but non-culturable state in microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(8): 1331-1339 (in Chinese).
- [28] PULSCHEN AA, BENDIA AG, FRICKER AD, PELLIZARI VH, GALANTE D, RODRIGUES F. Isolation of uncultured bacteria from Antarctica using long incubation periods and low nutritional media[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1346.
- [29] MUKAMOLOVA GV, TURAPOV OA, KAZARIAN K, TELKOV M, KAPRELYANTS AS, KELL DB, YOUNG M. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor[J]. Molecular Microbiology, 2002, 46(3): 611-621.
- [30] KAEBERLEIN T, LEWIS K, EPSTEIN SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. Science, 2002, 296(5570): 1127-1129.
- [31] LAGIER JC, DUBOURG G, MILLION M, CADORET F, BILEN M, FENOLLAR F, LEVASSEUR A, ROLAIN JM, FOURNIER PE, RAOULT D. Culturing the human microbiota and culturomics[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(9): 540-550.
- [32] WANG FP, ZHOU YH, ZHANG XX, XIAO X. Biodiversity of deep-sea microorganisms[J]. Biodiversity Science, 2014, 21(4): 445-455.

廖丽, 微生物学博士, 中国极地研究中心(中国极地研究所)研究员, 上海交通大学海洋学院双聘博导。主要从事极端环境微生物资源、多样性、生存与适应机制等方面的研究。主持了国家重点研发计划课题、自然科学基金面上和青年等科研项目, 获上海市人才发展资金等资助。参加了第 32 次中国南极考察长城站度夏科考。在 *Microbiology Spectrum*、*Environmental Microbiology*、*Molecular Ecology* 等领域内主流期刊发表学术论文 30 余篇, 作为第一发明人已获得授权中国发明专利 3 项。

