

Progress on Methods for Increasing Microbial Culturability

Junxia Li, Chenguang Liu

Ocean University of China, Qingdao Shandong
Email: lijunxia0901@126.com, liucg@ouc.edu.cn

Received: Feb. 10th, 2016; accepted: Feb. 27th, 2016; published: Mar. 1st, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Microorganisms in nature have a tremendous species diversity and high value of utilization. However, only a small proportion of microbes in nature can be cultured under laboratory conditions. That is because most microorganisms cannot be cultured under traditional cultivation methods and technologies. This review summarized the factors influencing culturability and new cultivation technologies, focusing on microbiological culture medium modification, gelling agent selection and the improvement culture condition. These technologies significantly increased microbial culturability, resulting in new microbial species isolation and identification, and consequently improved microbial species diversity. Applications of these technologies may exert great effect on microbial resource development.

Keywords

Uncultured Microorganisms, Cultivation Method, Cultivation Technology, Gelling Agent

提高微生物可培养性的方法的研究概况和进展

李俊霞, 刘晨光

中国海洋大学, 山东 青岛
Email: lijunxia0901@126.com, liucg@ouc.edu.cn

收稿日期: 2016年2月10日; 录用日期: 2016年2月27日; 发布日期: 2016年3月1日

摘要

自然界中的微生物具有非常丰富的物种多样性, 具有巨大的资源利用价值。然而, 目前为止, 可以在实验室中培养的微生物总数只是自然界微生物多样性的一小部分, 绝大多数微生物不能利用传统的培养技术和培养方法获得纯培养。本文简述了一些影响微生物可培养性的因素和近年来出现的一些新颖的微生物培养技术, 重点介绍了通过改良微生物培养基的组成, 改变微生物培养基的凝胶剂和改善微生物培养条件在提高微生物的可培养性方面取得的显著进展。这些方法的研究, 显著提高了微生物的可培养性, 分离和鉴定了许多微生物新种, 丰富了微生物的物种多样性, 为微生物资源的开发和利用奠定了基础。

关键词

不可培养微生物, 培养方法, 培养技术, 凝胶剂

1. 引言

微生物作为一种可操作性强、生长周期短、高效率的生产力, 能够分泌多种多样功能各异的活性物质, 在天然药物的开发、食品加工、环境处理中应用广泛。然而随着已知活性物质的不断增加, 新的活性物质的发现愈来愈困难, 因此, 为了解决这一问题需要发现更多的分泌活性物质的新菌种。微生物培养技术可以使研究者能从微生物单一克隆的角度对微生物细胞进行研究, 加深对微生物细胞形态结构、生理和遗传特性的认识, 以此来实现微生物的开发和利用。传统微生物培养技术(即纯培养技术), 是通过微生物进行分离、纯化和培养来获取微生物纯培养的技术, 如固体培养基分离、液体培养基分离和显微操作—孢子挑取。

然而研究和分析表明, 传统的培养技术和培养方法并不适合自然界中绝大多数微生物的培养, 依照现有的培养技术和方法, 不同生境微生物可培养率的检测结果是: 海水中约为 0.001%~0.1%, 淡水中约为 0.25%, 土壤中约为 0.3%, 活性污泥中约为 1%~15% [1]。人们把环境中这种在现有培养技术条件下尚未获得纯培养的微生物称为不可培养微生物(Uncultured microorganisms) [2]。为了克服现有培养方法的局限性, 研究者开发了一系列分子生物学方法, 这类研究方法不依赖微生物培养技术, 用于微生物群落的研究。目前被广泛应用的分子生物学方法有聚合酶链式反应(PCR) [3]、荧光原位杂交(FISH) [4]、单链构象多态性(SSCP) [5]、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP) [6]以及宏基因组研究(Metagenomics)等。

但是微生物的生理特征和代谢功能只有在其获得纯培养的条件下进行研究。对难培养微生物进行广泛深入的研究, 不仅可以丰富微生物学基础理论知识, 也可以对未培养微生物资源进行开发利用。因此, 在利用分子生物学技术研究微生物多样性、开发微生物基因资源的同时, 需要不断开发新的微生物培养方法, 来获得更多的微生物纯培养, 这样才能深入的研究微生物的综合特性, 以此来实现微生物资源的开发和利用。

2. 传统微生物培养方式的局限性

影响微生物生长的因素可以归纳如下:

1) 破坏了原生境中微生物的生态关系: 在自然界中微生物种群间关系复杂, 实验室微生物的培养可能破坏了自然环境中微生物之间的相互作用, 如生长较快的微生物可能抑制那些生长较缓慢的微生物, 从而导致细胞间通讯的不平衡, 或者是其可能产生抑制化合物, 导致其附近的微生物生长受到影响。

2) 营养成分过高的培养基: 实验室所提供的高浓度的培养基对一些利用高浓度营养物的微生物种群

来说可以提高其可培养性,但是在自然界中大部分微生物是在中低营养甚至是寡营养条件下生长的,这类微生物尤其是在寡营养条件下进化的海洋细菌,会因高浓度营养的抑制而停止生长,呈现不可培养的状态[7]。另外,在高营养培养基上,微生物早期会快速生长,产生大量的过氧化物、自由基和超氧化物,这类物质的积累会破坏微生物细胞结构,微生物将会死亡或处于休眠状态,表现为不可培养的状态。

3) 不能完全还原微生物原生境条件:对有些微生物的生境了解的尚不充分,导致不能完全模拟微生物的自然生存条件。在实验室中我们往往将微生物置于 pH 一定,恒温,黑暗或光照等小环境中培养,并且对于大多数微生物而言,分离、纯化对微生物本身就是一种生态灾难,它们由于不能适应环境的变化而难以复苏形成菌落,从而导致微生物的不可培养[8]。

4) 由于细胞密度检测方法的限制,生长缓慢的微生物往往会被忽略。

以上列举了一些限制微生物培养的原因,从根本上来说,一是由于现有条件的限制,还不可能完全模拟其原有的生长环境,而更重要的是由于人们对微生物生境的复杂性、微生物生长条件及其规律性的了解还非常有限所致。针对这些缺陷,研究者已经陆续研发出一系列改善微生物培养的新技术和新方法。

我们曾经介绍了应用一些新型的培养技术如扩散盒培养技术、细胞微囊包埋技术、稀释培养技术和高通量培养技术(HTC)等[9]在提高微生物的可培养性方面的作用。本文介绍这类技术的另一方面,即通过凝胶剂的选择、培养基成分的改良及培养条件的改变等来提高微生物的可培养性的研究概况和进展。

3. 固体培养基凝胶剂的选择

凝胶剂是一种添加到微生物液体培养基中使其形成半固体或固体培养基的添加剂。凝胶剂通常是一些胶体多糖和某些微生物和植物来源的蛋白质,通过形成连续的三维的分子网络在培养基中作为凝胶剂或稳定剂。凝胶剂不仅为培养基提供支持作用,并且还可以影响培养基中营养基质的扩散。扩散率取决于培养基的粘度,其粘度取决于凝胶剂的浓度和物理化学特征。某些凝胶剂在液体状态和固体状态之间是可逆的,这取决于温度,这一属性无疑增加了其使用范围。一种好的凝胶剂应该是无色,无味,并具有良好的保湿性。

自 Robert Koch 以后,大多数微生物学家往往会使用琼脂作为微生物培养基的凝胶剂,用于微生物的分离和培养。之所以被广泛应用是由于其在培养过程中较高的稳定性,较高的透明度,无毒性及其抗降解特性。但是,琼脂的一些性质也限制了它的应用,如在 85℃时,琼脂凝胶就会发生熔化,并且酸碱度是琼脂能否凝固的关键因素, pH 在 4.3~10.0 的范围内,琼脂可以正常凝固,其他 pH 条件下,培养基不能凝固[10]。因而琼脂不能用于极端微生物如嗜碱、嗜酸和嗜热菌株的分离培养,所以寻找耐酸、耐热和耐碱的凝胶剂是很必要的。

另外由于琼脂资源的过度开发导致细菌级的琼脂的价格高昂,因此越来越多的研究者致力于寻找琼脂的替代品。随着时间的推移发现了多种凝胶剂作为琼脂的替代品,如卡拉胶、 κ -卡拉胶、结冷胶、车前子多糖、瓜儿豆胶和黄原胶[11]。

3.1. 卡拉胶

卡拉胶,是一种从角叉菜(*Chondrus crispus*)细胞壁中提取获得的多糖,卡拉胶具有不同的分子结构,其基本骨架是 $\alpha \rightarrow 1,3$ 和 $\beta \rightarrow 1,4$ 糖苷键交替联结形成的半乳聚糖重复单元。卡拉胶共有七中类型,其中已经商品化的有 κ 型、 ι 型和 λ 型三种。 κ -卡拉胶形成凝胶有一定的脆性, ι -卡拉胶形成的凝胶弹性较好,而 λ -卡拉胶不能形成凝胶。Isabella A 等利用一些常见菌株和几种难培养菌株作为试验菌株证明卡拉胶可以用于微生物的培养[12]。并且在较高 pH 条件下,卡拉胶依然可以强度较高的凝胶,因而可以用于嗜碱菌的分离培养。Sumitra D.等利用 κ -卡拉胶作为培养基凝胶剂时,在 pH 8.0~13.5 的范围内,卡拉胶都能

形成可用于微生物培养的凝胶, 并且成功分离培养出了极端碱性条件下生长的微生物[13]。

3.2. 结冷胶

结冷胶是由鞘氨醇单胞菌产生的一种细胞外杂多糖, 单糖组份主要包括 β -D-葡萄糖, β -D-葡萄糖醛酸和 α -L-鼠李糖。和其他凝胶剂相比, 结冷胶能在较低 pH 条件下形成热稳定的凝胶, 并在 110℃ 时结冷胶凝胶才会熔化, 因此可以用于分离培养嗜酸和嗜热菌株[14]。和琼脂相比, 结冷胶在较低的浓度(大约为 0.5%~1.0%)就能形成高强度的凝胶, 同时还具有较高的透明度有利于发现和筛选平板上较微小的菌落[15]。研究和分析表明, 结冷胶培养基还可促进或不影响那些被琼脂抑制的细菌的生长。冯福应等在研究乌梁素海富营养化水体中可培养微生物的多样性时, 设计了结冷胶和琼脂的对比培养基, 结果表明采用结冷胶作为凝胶剂的固体培养基上生长的微生物总数大约是以琼脂作为凝胶剂的固体培养基上的 3 倍, 另外, 从菌落的形态等性状上也可以看出结冷胶培养基上的微生物种类显著高于琼脂培养基上的[16]。Hideyuki T 等关于淡水湖沉积物中微生物多样性的研究结果显示结冷胶培养基上微生物的菌落数是琼脂培养基上的 10 倍, 并且结冷胶培养基上微生物的 60% 是新种, 为琼脂培养基的 2 倍[17]。另外从结冷胶培养基上分离得到的 108 株细菌中, 有 22 株细菌不能在琼脂培养基上形成菌落, 剩余的 86 株细菌中, 有 52 株细菌在结冷胶培养基上形成菌落所需时间比琼脂培养基上短[18]。Janssen 和其同事研究表明在土壤微生物培养中, 以结冷胶作为凝胶剂的培养基具有较大的优势, 他们成功的培养并分离出了一些难以培养的微生物新种[19]-[21]。

3.3. 车前子多糖

车前子多糖是从卵叶车前属的种子外壳中提取的一种杂多糖, 主要由木糖, 阿拉伯糖, 半乳糖醛酸和微量的鼠李糖及半乳糖组成的。研究显示, 车前子多糖可以抵抗人消化酶和细菌的降解。Sanjay S 使用 5% 的车前子多糖制备出的培养基可用于微生物的培养[22], 并且 4% 的车前子多糖和 0.5% 的琼脂的复合凝胶的凝胶强度高于琼脂。车前子多糖的保水性能优良, 改善了琼脂失水容易干裂的情况, 有利于菌种的保藏。另外其凝胶在大于 100℃ 时熔化, 因而还可用于嗜热菌株的分离培养。并且其植物来源的广泛分布, 使车前子多糖和其他凝胶剂相比, 其价格更便宜。

3.4. 瓜尔豆胶

瓜尔豆胶是从一种一年生草本豆科植物—瓜尔树的种子胚乳中提取的多糖, 其糖链中每两个甘露糖中接一个半乳糖单元, 分子量为 22 万。它在冷水和热水中都能完全溶解, 并且较低浓度就能达到较高的黏度。在温度为 70℃ 时, 瓜尔豆胶不熔化, 可以用于嗜热菌的分离和保藏[23]。并且瓜尔豆胶在不同的条件下得到性质各异的胶体, 为优良的微生物培养基凝胶剂[24]。另外, 瓜尔豆胶的价格比琼脂低 8 倍, 因而其有较大的应用价值。

3.5. 黄原胶

黄原胶是由野油菜单胞菌通过糖发酵获得的一种胞外多糖。它由五糖重复单元聚合而成, 主链由 β -1,4 糖苷键相连的葡萄糖构成, 甘露糖-葡萄糖-甘露糖组成其侧链。黄原胶具有较高的抗酶降解的性质, 并在较宽范围的 pH 和温度条件下形成稳定的凝胶[25]。Babbar 等观察 6 种细菌和 6 种真菌在黄原胶培养基和黄原胶-琼脂培养基的生长情况, 结果表明, 这两种培养基上生长出的菌落与琼脂培养基的均具有一致的生长特征。而且真菌在黄原胶培养基和黄原胶-琼脂培养基的生长比琼脂培养基上好。另外黄原胶培养基不易干裂和失水, 因而更适合对培养物作长期保存。但其缺点是单独使用黄原胶只能形成弱凝胶, 其凝胶强度不能用于微生物的划线培养, 这一问题可以通过加入 0.3% 琼脂解决, 其成本比单用琼

脂便宜 3 倍[26]。

4. 改良微生物培养基的组成

4.1. 添加非传统的碳源、电子供体或电子受体

不同类型的微生物的代谢过程往往是不同的, 因此其对反应的底物种类的要求也不同。因此根据微生物需要为其提供特定的反应底物, 有利于微生物的正常生长。已有大量的研究表明, 在微生物的分离培养中应用新颖的反应底物作为电子受体有利于发现未知物种的微生物。Santiti 等在培养基中添加亚砷酸盐作为反应底物, 从澳大利亚金矿中分离出了化能自养菌 NT-26, 细菌 16S rRNA 基因序列比对结果表明, 该菌有可能是 α -变形菌纲中的一个新种[27]。Sorokin 等从富含硫化物的碱湖沉积物中分离出 15 中硫酸盐还原细菌, 其中 4 中属于 *Desulfonatronum*, 其余的属于 *Desulfonatronovibrio*, 这些菌株和已有菌株基因序列的相似性是较低[28]。

4.2. 添加信号分子或其类似物来维持微生物之间的相互作用

自然环境中微生物之间存在复杂的相互作用, 需要信息的传递来维持, 因此在进行培养时, 可以向培养基中添加一些有利于微生物沟通的信号分子, 如环磷酸腺苷(cAMP)和酰基高丝氨酸内酯(AHL)。信号分子可能促进细菌的生长。虽然 Coppola 等[29]研究发现在培养基中加入 5 mM cAMP 对大肠杆菌的生长有抑制作用, 并且 Chen 和 Brown [30]研究发现 cAMP 浓度为 0.01~100 μ M 时, 嗜肺军团菌的增长率不一致, 但是也有实验证明信号分子 ATP, cAMP 和酰基高丝氨酸内酯可以显著提高海洋细菌的培养效率, 在液体培养基中加入 10 μ M cAMP, 培养效率可达到 100% [31]。这是因为自然环境中微生物之间存在一定的相互作用, 加入 cAMP 就可以简单的模拟微生物之间的相互作用, 使更多的细菌获得纯培养。

4.3. 加入具有活性氧降解能力的物质

微生物培养中, 微生物的代谢会产生一些活性氧物质, 影响微生物的生长。为了减少代谢过程中产生的活性氧, 可在培养基中加入可以降解活性氧的物质, 例如在培养基中加入过氧化氢酶、丙酮酸钠和 α -酮戊二酸等这类过氧化氢降解物。岳秀娟等在培养微生物时在培养基中添加丙酮酸钠、过氧化氢酶等物质, 结果发现平板上生长的菌落数比对照组高出 25%~42%, 并从平板上分离到多株具有抗菌活性的放线菌和真菌, 为抗生素的筛选提供新的途径[32]。

4.4. 寡营养培养基

长期以来, 人们秉承富营养可以获得更多的微生物, 但是, 研究发现富营养培养基致使快速生长的微生物抑制缓慢生长的微生物的生长[33]。另外高浓度营养成分的培养基往往会产生活性氧物质, 这就导致所获得的微生物的种类和数量都会减少。寡营养的培养基可以有效的抑制优势菌株的过度生长, 从而减少微生物之间的相互抑制, 提高菌落的多样性。研究发现利用稀释的培养基可以从各种水生和陆生环境中分离出传统的培养方式难培养的微生物 [33] [34]。

4.5. 添加细菌实现共培养

在微生物生长环境中, 细菌间的相互作用有利于微生物的生长, 因此在实验室培养某种特定细菌时, 会在其培养基中添加其辅助细菌, 以此来获得纯培养[35]。根据这一原理, Burmole 等设计出一种双层培养基。即先倒一层培养基, 待培养基凝固后, 涂布其辅助细菌菌液, 晾干后, 再倒一层培养基, 然后涂布环境样品。其培养结果显示这种方法获得的菌落数高于单层培养基 20%~40%。该方法的优点是模仿了环境中微生物之间的相互关系, 有利于促进微生物的培养[36]。

5. 微生物培养条件的改善

5.1. 延长微生物的培养时间

许多细菌,特别是那些寡营养环境中的微生物的生长是很缓慢的。延长细菌的培养时间是培养这些微生物的先决条件,这样可以使混合的微生物中生长较快的微生物随时间逐渐死亡,减少细菌间的竞争。土壤微生物的培养时间为12周时,可以增加细菌的菌落数,并且随时间的推移细菌的复苏率会逐渐增加[19]。同样的,培养时间为12周时,可以成功的分离出SAR11菌属的菌株[37]。当培养时间为50d时, TM7菌属的菌株可以形成肉眼可见的菌落,并且TM7菌属的菌株在这之前为未培养微生物[38]。

5.2. 选择适当的氧环境

传统的微生物培养方法是在空气中或无氧条件下进行的,培养环境中氧气的含量对微生物生长的影响是人们常常忽视的问题。实际上在自然条件下微氧环境在无氧环境和有氧环境的接触面是很常见的。在很多微氧环境中都发现了微需氧微生物,如深海沉积物、海洋沉积物、沿海水域、土壤、淡水和活性污泥样品。另外,在活的寄主中也存在微需氧微生物。但是,这种微生物在环境中的多样性、分布和生态作用还有待进一步研究。微需氧微生物,其生长所需的最佳氧分压低于一个大气压,和好氧微生物相比,在微氧环境中可能存在一定的竞争优势。一些典型的微需氧微生物如弯曲杆菌已经被广泛的研究过了。另外,致病微生物如原生动植物梅毒螺旋体和贾第虫属,细菌包柔氏螺旋体和螺杆菌是典型的微需氧细菌。

M.K. Mannisto 培养地下水微生物的研究中,分离得到的39株菌株利用两种培养基培养,结果显示在葡萄糖和PYGV半固体培养基上,分别有59%和28%的菌株呈现微需氧的状态[39]。空肠弯曲杆菌是一种微需氧细菌,其细胞密度较低时,细菌只在微氧条件下生长[40]。另外胞内菌的生长环境往往是低氧的,因此胞内菌的培养要控制培养环境中氧气的浓度。沙氏肾杆菌是细菌性肾病的病原体,这种细菌曾经被认为是一种严格好氧菌株。但是Varpu H. K.的研究结果表明沙氏肾杆菌在微氧环境中生长良好,和有氧条件相比,在微氧条件下生长的菌落更大,并且更有黏性[41]。Anders O.等研究表明引起Q热的细菌病原体伯纳特氏立克次氏体是一种微需氧微生物,在复合培养基CCM上复制所需的最佳氧浓度为2.5%,为一微氧环境[42]。

6. 结束语

综上所述,通过固体培养基凝胶剂的选择,改良微生物培养基的组成和微生物培养条件的改善,以及一些新技术的应用显著的提高了微生物的可培养性,极大地丰富了微生物的多样性。然而,由于微生物生境的复杂性和未培养微生物的多样性,目前对微生物的探索仍旧面临着巨大的挑战。因此,需要不断改善现有技术和方法,新技术与分子生物学技术的结合,发明新的培养技术,以培养出更多的“不可培养微生物”。

基金项目

本课题获国家“863”项目基金资助:深海微生物分离培养与基因资源获取技术研究 2012AA092103。

参考文献 (References)

- [1] 牛丽纯, 孙玉芳, 赵天琦, 等. 未培养微生物的限制因素及培养方法研究进展[J]. 微生物前沿, 2014, 3(2): 17-28. <http://dx.doi.org/10.12677/AMB.2014.32003>
- [2] Newman, D.K. and Banfield, J.F. (2002) Geomicrobiology: How Molecular-Scale Interactions Underpin Biogeochemical Systems. *Science*, 296(5570): 1071-1077. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1010716>

- [3] Woese, C.R. and Fox, G.E. (1977) Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**, 5088-5090. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- [4] Annelie, P., Jakob, P. and Rudolf, A. (2002) Fluorescence *in Situ* Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied & Environmental Microbiology*, **68**, 3094-3101. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.6.3094-3101.2002>
- [5] Peters, S., Koschinsky, S., Schwieger, F., *et al.* (2000) Succession of Microbial Communities during Hot Composting as Detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based Genetic Profiles of Small-Subunit rRNA Genes. *Applied & Environmental Microbiology*, **66**, 930-936. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.3.930-936.2000>
- [6] Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., *et al.* (1997) Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *Applied & Environmental Microbiology*, **63**, 4516-4522.
- [7] 田甜, 李冬梅, 戴世鲲, 等. 海洋环境中难培养微生物的寡营养培养[J]. 微生物学通报, 2009(36): 1031-1039.
- [8] 王丽玲, 林景星, 胡建芳. 深海热液喷口生物群落研究进展[J]. 地球科学进展, 2008, 23(6): 604-612.
- [9] 袁东芳, 于乐军, 刘晨光. 海洋微生物高通量培养方法和分选技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(6): 1180-1187.
- [10] Scholten, H.J. and Rlm, P. (1998) Agar as a Gelling Agent: Chemical and Physical Analysis. *Plant Cell Reports*, **17**, 230-235. <http://dx.doi.org/10.1007/s002990050384>
- [11] Das, N., Tripathi, N., Basu, S., Bose, C., Maitra, S. and Khurana, S. (2015) Progress in the Development of Gelling Agents for Improved Culturability of Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 698. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00698>
- [12] Abbott, I.A. and Chapman, F.A. (1981) Evaluation of Kappa Carrageenan as a Substitute for Agar in Microbiological Media. *Archives of Microbiology*, **128**, 355-359. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00405912>
- [13] Datta, S., Mody, K., Gopalsamy, G. and Jha, B. (2011) Novel Application of κ -Carrageenan: As a Gelling Agent in Microbiological Media to Study Biodiversity of Extreme Alkaliphiles. *Carbohydrate Polymers*, **85**, 465-468. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.036>
- [14] Lin, C.C. and Casida, L.E. (1984) GELRITE as a Gelling Agent in Media for the Growth of Thermophilic Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, **47**, 427-429.
- [15] Shungu, D., Valiant, M., Tutlane, V., Weinberg, E., Weissberger, B., Koupal, L., Gadebusch, H. and Stapley, E. (1983) GELRITE as an Agar Substitute in Bacteriological Media. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**, 840-845.
- [16] 金一获. 基于结冷胶培养基的乌梁素海富营养化水体中可培养细菌的多样性分析[D]: [硕士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011.
- [17] Hideyuki, T., Yuji, S., Satoshi, H., Nakamura, K., Nomura, N., Matsumura, M. and Kamagata, Y. (2005) Comparative Analysis of Bacterial Diversity in Freshwater Sediment of a Shallow Eutrophic Lake by Molecular and Improved Cultivation-Based Techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 2162-2169. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.4.2162-2169.2005>
- [18] Tamaki, H., Hanada, S., Sekiguchi, Y., Tanaka, Y. and Kamagata, Y. (2009) Effect of Gelling Agent on Colony Formation in Solid Cultivation of Microbial Community in Lake Sediment. *Environmental Microbiology*, **11**, 1827-1834. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01907.x>
- [19] Kathryn, E.R.D., Shayne, J.J. and Peter, H.J. (2005) Effects of Growth Medium, Inoculum Size, and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 826-834. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.2.826-834.2005>
- [20] Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M. and Sait, M. (2002) Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2391-2396. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.5.2391-2396.2002>
- [21] Sait, M., Hugenholtz, P. and Janssen, P.H. (2002) Cultivation of Globally Distributed Soil Bacteria from Phylogenetic Lineages Previously Only Detected in Cultivation-Independent Surveys. *Environmental Microbiology*, **4**, 654-666. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00352.x>
- [22] Sahay, S. (1999) The Use of Psyllium (Isubgol) as an Alternative Gelling Agent for Microbial Culture Media. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **15**, 733-735. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008954128637>
- [23] 黎丽华. 瓜尔胶的改性、共混及其应用研究[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 武汉大学, 2004.
- [24] Jain, R., Anjaiah, V. and Babbar, S.B. (2005) Guar Gum: A Cheap Substitute for Agar in Microbial Culture Media. *Letters in Applied Microbiology*, **41**, 345-349. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01760.x>

- [25] Petri, D.F.S. (2015) Xanthan Gum: A Versatile Biopolymer for Biomedical and Technological Applications. *Journal of Applied Polymer Science*, **132**, 1-13. <http://dx.doi.org/10.1002/app.42035>
- [26] Babbar, S.B. and Jain, R. (2006) Xanthan Gum: An Economical Partial Substitute for Agar in Microbial Culture Media. *Current Microbiology*, **52**, 287-292. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-005-0225-5>
- [27] Santini, J.M., Sly, L.I., Schnagl, R.D. and Macy, J.M. (2000) A New Chemolithoautotrophic Arsenite-Oxidizing Bacterium Isolated from a Gold Mine: Phylogenetic, Physiological, and Preliminary Biochemical Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 92-97. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.1.92-97.2000>
- [28] Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Kolganova, T.V., Detkova, E.N., Galinski, E.A. and Muyzer, G. (2011) Culturable Diversity of Lithotrophic Haloalkaliphilic Sulfate-Reducing Bacteria in Soda Lakes and the Description of *Desulfonatronum thioautotrophicum* sp. nov., *Desulfonatronum thiosulfatophilum* sp. nov., *Desulfonatronovibrio thiodismutans* sp. nov., and *Desulfonatronovibrio magnus* sp. nov. *Extremophiles*, **15**, 391-401. <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-011-0370-7>
- [29] Coppola, S., Zoina, A. and Marino, P. (1976) Interactions of N6-(delta2-isopentenyl)adenine with Cyclic AMP on the Regulation of Growth and Beta-Galactosidase Synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, **94**, 436-438. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-94-2-436>
- [30] Chen, G.C.C. and Brown, A. (1985) Bacterial Growth and the Concentrations of Cyclic Nucleotides in *Legionella pneumophila* Cultures. *Current Microbiology*, **12**, 23-26. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01567748>
- [31] Bruns, A., Cypionka, H. and Overmann, J. (2002) Cyclic AMP and Acyl Homoserine Lactones Increase the Cultivation Efficiency of Heterotrophic Bacteria from the Central Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3978-3986. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.8.3978-3987.2002>
- [32] 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.
- [33] Connon, S.A. and Giovannoni, S.J. (2002) High-Throughput Methods for Culturing Microorganisms in Very-Low-Nutrient Media Yield Diverse New Marine Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3878-3885. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.8.3878-3885.2002>
- [34] Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L. and Giovannoni, S.J. (2002) Cultivation of the Ubiquitous SAR11 Marine Bacterioplankton Clade. *Nature*, **418**, 630-633. <http://dx.doi.org/10.1038/nature00917>
- [35] Nichols, D., Lewis, K., Orjala, J., Mo, S., Ortenberg, R., O'Connor, P., Zhao, C., Vouros, P., Kaeberlein, T. and Epstein, S.S. (2008) Short Peptide Induces an "Uncultivable" Microorganism to Grow *in Vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 4889-4897. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00393-08>
- [36] Burmølle, M., Johnsen, K., Al-Soud, W.A., Hansen, L.H. and Sørensen, S.J. (2009) The Presence of Embedded Bacterial Pure Cultures in Agar Plates Stimulate the Culturability of Soil Bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, **79**, 166-173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.08.006>
- [37] Song, J., Oh, H.M. and Cho, J.C. (2009) Improved Culturability of SAR11 Strains in Dilution-to-Extinction Culturing from the East Sea, West Pacific Ocean. *FEMS Microbiology Letters*, **295**, 141-147. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01623.x>
- [38] Hugenholtz, P. (2002) Exploring Prokaryotic Diversity in the Genomic Era. *Genome Biology*, **3**, reviews0003.
- [39] Männistö, M.K. and Puhakka, J.A. (2002) Psychrotolerant and Microaerophilic Bacteria in Boreal Groundwater. *FEMS Microbiology Ecology*, **41**, 9-16. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00262-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00262-3)
- [40] Kaakoush, N.O., Miller, W.G., Reuse, H.D. and Mendz, G.L. (2007) Oxygen Requirement and Tolerance of *Campylobacter jejuni*. *Research in Microbiology*, **158**, 644-650. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2007.07.009>
- [41] Hirvelä-Koski, V. (2008) The Fish Pathogen *Renibacterium salmoninarum*: Growth in a Microaerophilic Atmosphere. *Veterinary Microbiology*, **127**, 191-195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.011>
- [42] Anders, O., Cockrell, D.C., Dale, H., Fischer, E.R., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Porcella, S.F. and Heinzen, R.A. (2009) Host Cell-Free Growth of the Q Fever Bacterium *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 4430-4434. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0812074106>