



肠道微生物培养的研究进展及应用

刘莎, 陈从英*

江西农业大学 省部共建种猪遗传改良与养殖技术国家重点实验室, 江西 南昌 330045

刘莎, 陈从英. 肠道微生物培养的研究进展及应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 881-899.

LIU Sha, CHEN Congying. Research progress and application of gut microorganism culture[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(3): 881-899.

摘要: 肠道中栖居着组成复杂、功能多样的微生物群, 这些微生物群在宿主免疫、营养吸收、代谢调节等方面发挥着重要作用。随着测序技术的快速发展, 肠道微生物研究通过 16S rRNA 基因测序和宏基因组测序产生了大量的数据, 其中许多未组装的序列成为微生物“暗物质”。近年来, 不少研究利用多种不同微生物分离培养方法, 结合高通量鉴定技术, 从人、小鼠、猪肠道中分离了大量的微生物, 丰富了菌株资源, 为解析微生物“暗物质”以及后续肠道微生物功能和应用研究提供了基础和保障。尽管微生物的可培养性受到多种因素的影响, 大部分微生物尚处于“未培养”的状态, 但无论是病因研究还是生理和遗传特征的解析都离不开微生物实体资源的获取。肠道微生物的分离培养对微生物研究从关联分析向菌群功能验证、因果机制解析和功能菌株开发的深入研究具有重要意义。本文旨在探讨和综述影响微生物可培养性的因素, 总结回顾肠道微生物的培养方法并阐述肠道微生物培养研究的进展, 以期能为肠道微生物培养研究提供新的视角。

关键词: 肠道微生物; 分离培养; 培养方法; 菌株资源开发

Research progress and application of gut microorganism culture

LIU Sha, CHEN Congying*

State Key Laboratory of Pig Genetic Improvement and Production Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

Abstract: The gut harbors the microbiota with complex structure and diverse functions, which

资助项目: 江西省自然科学基金(20202BAB205003); 国家自然科学基金(31772579)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20202BAB205003) and the National Natural Science Foundation of China (31772579).

*Corresponding author. E-mail: Chcy75@hotmail.com

Received: 2022-07-11; Accepted: 2022-09-26; Published online: 2022-09-30

plays an important role in host immunity, nutrient absorption, and metabolic regulation. The rapid development of sequencing technologies such as 16S rRNA gene sequencing and metagenomic sequencing has generated massive data of gut microbiota, among which many unassembled sequences are considered as the microbial dark matter. Through the combination of a variety of culture methods and high-throughput sequencing, a large number of microorganisms have been isolated from the guts of human, mouse, and pig in recent years, which has significantly enriched the bacterial strain resources and provided a basis for the analysis of microbial dark matter and the research on the functions and application of gut microbiota. Although the culturability of microorganisms is affected by many factors and most microorganisms are still uncultured, the acquisition of microbial resources is indispensable for the study of etiology and the analysis of physiological and genetic characteristics of bacterial strains. The isolation and culture of gut microorganisms are of great significance for the deep research on gut microbiota from association study to functional verification, causality elucidation, and functional strain development. This article summarized the factors that affect the culturability of microorganisms, introduced the culture methods of gut microorganisms, and reviewed the progress and application of gut microorganism culture, aiming to give new insights into this field.

Keywords: gut microorganisms; isolation and culture; culture method; development of bacterial strains

肠道微生物群对宿主健康至关重要。当肠道微生物失调时,常引起宿主免疫功能障碍^[1]、代谢紊乱^[2]、认知和生理发育受损^[3]。基于培养和培养的方法,对肠道微生物的多样性和功能有了更多新的认识^[4-6],但是目前对肠道微生物群的了解依然非常有限。根据人类胃肠道统一基因组(unified human gastrointestinal genome, UHGG)^[7]的最新报道,超过 70%的肠道微生物物种未被培养,40%的蛋白编码序列没有功能注释。这些未知的微生物及其遗传物质被称为肠道微生物的“暗物质”,它们隐藏着肠道微生物功能以及肠道微生物与宿主相互作用的分子机理^[8-10]。为了确定这些“暗物质”的身份并揭示其功能,人们已经做了很多努力来开发生物信息学工具和数据库^[11-12]。然而,在生物学、分子水平上的功能鉴定和验证仍然依赖于微生物培养,微生物研究的深入离不开微生物资源的获取。

目前的研究表明,分离培养的肠道微生物不仅在宿主-肠道微生物相互作用的机理研究中发挥着重要作用^[13-15],而且在组学研究中也发挥着互补作用^[16-18]。但是想要揭示肠道微生物的“暗物质”还需要在微生物培养以及生理和遗传特征解析方面进行广泛的努力。在过去的几年中,已有多项大规模肠道微生物培养的研究^[16,18-24],报道了超过 1 500 种可培养微生物。这些研究都证明了肠道微生物培养不仅是挖掘潜在益生菌、开发微生物生物技术、助力功能验证以及解析因果机制的基础,而且是推进高通量测序数据深入分析的钥匙。

1 影响肠道菌群可培养性的因素

科研人员在早期研究中便认识到在实验室分离和培养细菌存在较大的困难,并将存在于原生环境中的微生物与可在实验室培养的微生物

之间的差异称为“巨大的平板计数异常”^[25]。造成这种差异的原因包括微生物培养的底物及生长条件的不确定性、不同丰度微生物的竞争、休眠微生物的复苏以及共生微生物的相互依赖。

1.1 不确定的微生物培养底物及生长条件

通过在培养基中添加微生物生长所需的底物可用于富集和分离微生物,但想要在培养基中实现清晰明确的微生物生长条件还非常困难。许多微生物培养实验的成功与否严格取决于特定的环境条件和各种生长因子(如维生素、氨基酸、核苷酸和无机化合物)的存在,有些生长因子通常难以识别,因此在实验室中难以模拟^[26]。有些无机化合物(金属、硫和氮化合物)在生物化学循环中具有十分重要的作用,但它们在环境中的浓度可能低于检测范围。另外,尽管某些微生物生长所需的底物可以从其基因组序列中推断出来,但许多微生物都使用相似的底物,这在没有功能数据的情况下也很难精确预测。其次,环境条件如温度、pH、盐度和氧化还原条件,也是微生物培养的重要因素。在微生物群落中,某些微生物的生长依赖于环境中其他的微生物,这使得微生物的分离变得更加复杂。此外,厌氧微生物的培养有很高的技术要求,特别是涉及细胞分选和在滴定板中生长的高通量技术。使用厌氧工作站是最方便的厌氧微生物富集和培养的解决方案(例如,用于细胞接种和分选以及转移富集培养物),通过安装空气过滤装置可以减少实验污染,但仍然很难维持无菌条件。这些因素都极大地限制了实验室中肠道微生物的分离培养。

1.2 不同丰度微生物的竞争

许多微生物在复杂的微生物群落中丰度低,对这些微生物的分离培养产生影响^[27]。为了成功分离出这些稀有的微生物,常用的方法是通过分析可用的16S rRNA基因数据来确定这些微生物所在的高丰度部位,并作为最佳采样位置来提

高分离率。但在实际操作中,即使稀有微生物成功分离,也很容易在后续培养实验中被生长较快的微生物快速消耗培养基营养物质而被抢占主导地位,最终导致培养失败。因此,最近开发了从样本中直接分离单个微生物用作接种物的方法来解决这一问题^[28]。而对于不适应富营养环境的微生物,有效的方法是使用寡营养培养基进行培养^[29],但是受到实验室次优培养条件的影响,微生物的生长速率可能与原生环境中的自然生长速率有很大差异,微生物生长更缓慢,培养时间跨度更长。尽管通过优化生长条件可以提高生长速度,但培养时间的延长和研究成本的增加,限制了人们对低丰度微生物培养的研究。

1.3 休眠微生物的复苏

当微生物处于对其生长不利的环境时会进入休眠,这是一种可逆的低代谢活动状态,可降低微生物的能量消耗并逃避不利环境的影响^[30]。例如,导致结核病的结核分枝杆菌在初次感染后能够在休眠状态下徘徊数年至数十年。事实上,由于微生物在休眠和活跃状态之间转变的潜在机制仍然知之甚少,仍未培养的大部分微生物可能生存在由其他优势微生物主导的环境中,因此休眠微生物的复苏是微生物培养中的一个重要挑战。目前认为休眠微生物的复苏是随机的过程,可能会受到一些化合物的影响^[31]。而且由于不同微生物可能进化出不同的机制来调节休眠,因此难以找到统一的解决方案使微生物从休眠状态中复苏。这种潜在的变异性也加大了微生物培养工作的复杂性。

1.4 共生微生物的相互依赖

微生物之间存在着错综复杂的关系网络,包括通过氨基酸、维生素等生长因子的交换来促进彼此生长的共生关系^[32-33]。共生微生物在原生环境中可稳定地协同生长,但在单独分离的情况下,往往会由于共生关系遭到破坏而无

法正常生长。因此,已有研究尝试利用电化学生物系统模拟共培养时产甲烷菌对 H_2 的消耗来维持原有的共生关系,从而成功富集了共生菌 *Syntrophomonas zehnderi*^[34]。事实上,共生微生物相互接触或位置接近也是微生物生长的一个重要因素,但在透析膜隔开的隔室中生长的共生微生物的生长速度会低于自然接触时的生长速度^[35]。因此,分离培养共生微生物在当前来说还十分棘手。

2 肠道微生物分离培养方法的研究进展

在研究过程中对微生物的分离和培养存在着的广泛需求促使了许多微生物培养方法的发展。在对样品预处理后,肠道微生物的培养工作在流程上可大致分为:细菌的分离与培养、培养分离物的鉴定、菌株的分类命名及保藏。每一步骤都可以采用不同的方法进行组合,最终的实验方案根据实验目的以及实验的实际情况进行选择与调整。

2.1 分离培养方法

微生物培养的起源可以追溯到 19 世纪中叶,现代微生物培养的原理和一个多世纪前的早期原理相同^[36]。在微生物研究中,多种策略可以应用于富集并分离特定微生物,其中许多策略依赖于培养物的表型和基因型特征。另外,在选择最合适的分离措施时,研究人员的微生物分离经验也很重要。目前的分离方法大致可分为传统的梯度稀释平板涂布法及基于微流控、膜扩散和细胞分选的创新培养方法^[37]。

2.1.1 传统的分离培养方法

传统的梯度稀释平板涂布法可在固体培养基(通常是琼脂)表面接种梯度稀释的样品并进行菌群培养和菌落采集,针对不同的微生物也可以使用结冷胶和琼脂糖等替代固化剂^[38]。此外,

多种策略可以应用于富集并分离特定微生物,其中提高分离微生物多样性的策略包括设计营养培养基(例如使用血瓶预培养,添加羊血以及瘤胃液,使用特定底物)、应用物理化学条件(例如温度、pH、盐度和气体成分),添加选择性抑制剂(例如抗生素、乙醇和代谢抑制剂)以及特定生长因子(例如氨基酸、维生素和金属离子)。例如, Lagier 等^[39]应用传统的梯度稀释平板涂布结合基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)和 16S rRNA 基因测序的“培养组学(culturomics)”方法,成功分离了 1 057 种微生物,使从人类肠道中分离出至少 1 次的物种的数量翻了 1 番。通过添加抗氧化剂对基础培养基进行改良, Dione 等^[40]发现在有氧条件下, 276 种微生物(包括 82 种严格厌氧、154 种兼性厌氧、31 种好氧和 9 种微需氧细菌以及 10 种真菌)中有 237 种细菌和 10 种真菌都可在培养基中生长。鉴于梯度稀释平板涂布法具有多样化、可操作性强、可扩展等优点,目前这一传统的分离培养方法仍广泛应用。

2.1.2 创新的分离培养方法

由于传统的培养方法耗时耗力,不少研究也开发了一些创新的培养方法旨在提高感兴趣微生物的分离效率,主要包括基于微流控、膜扩散以及细胞分选的培养方法。这些方法或是依靠高通量培养技术来扩大菌群分离的数量从而增加分离感兴趣物种的机会,或是选择性地分离具有特定功能特征或属于特定分类群的微生物。

基于微流控的培养方法拥有实验装置小型化、可扩展、高通量等优点,可在不同底物或不同物理化学条件下并行培养单个微生物,并有效分离低丰度菌株。因为微流控系统可以维持无氧或低水平氧含量的环境状态,因此可用于厌氧微生物的培养。在先前的一项研究中,研究人员利

用滑移芯片成功培养出了第 1 个瘤胃球菌属的菌株,该属是人类微生物组计划中“最想要”的分类群之一,证明了基于微流控的培养方法的有效性^[41]。另外, Villa 等^[42]结合液滴微流控和高通量测序技术,开发了一个用于分离和检测在液滴中生长的微生物的平台(microbiota members in picoliter droplets, MicDrop),利用这一平台成功培养出比经典的分批培养方法多 2.8 倍的细菌分类群。但基于微流控的培养过程中使用的极限稀释法对共生微生物的单个微生物培养十分不利且容易在稀释过程中丢失低丰度菌株。

基于膜扩散的培养方法可利用过滤膜实现微生物之间的分离,同时允许微生物与自然栖息环境有限地接触。在这种基于膜扩散的培养结构中,微生物可以从其自然环境中获得必要的生长因子,形成理想的菌落^[43]。此外,由分离的微生物产生的生长抑制代谢物可以自由地扩散开,而不是在局部积累^[44]。在一项研究中,研究人员设计了 1 个共培养系统,肠道细菌在由过滤膜隔开的软琼脂中共培养,以模拟体外细菌间的交流,成功分离了 3 株以前未培养的菌株^[45]。基于膜扩散的培养方法可模拟原位环境的生长条件并共培养维持微生物间通讯,避免了对微生物培养条件进行细致的开发,也避免了由传统培养基提供的对某些物种的生长有害的过量营养物质的积累。

细胞分选技术可用于从混合群落的微生物悬液中分离单个微生物。细胞分选的方法包括基于液滴和基于微流体的分选机、显微引导的光镊以及基于荧光信号的荧光激活细胞分选(flow cytometry sorting, FACS)。但这些方法对细胞的伤害较大。另外,反向基因组学^[46]可通过预测基因组中靶微生物细胞外暴露的保守的膜蛋白,将膜蛋白用作产生抗体的表位并进行荧光标记,在复杂的细菌悬液中通过产生的抗体与靶细菌

匹配的蛋白表位结合,从而实现荧光标记微生物。使用这种方法标记的单个细菌在分离之后依旧能保持活力,并可用作接种物来富集新的培养物^[46]。

事实上,创新的培养方法在肠道微生物培养研究中的应用还处于探索阶段,想要实现广泛应用还需要克服不少的挑战。例如,肠道内容物中除了微生物外还有许多非生物颗粒需要去除,否则会干扰基于分子标记和基于液滴培养方法的分离效果;肠道中大部分微生物都需要厌氧培养,而涉及细胞分选的培养设备通常较大,难以在典型的厌氧工作站中安装。总之,尽管通过人工梯度稀释后将样品涂布在平板上的培养方法既耗时又费力,但其依然是肠道微生物培养的主要方法。

2.2 鉴定方法

对于产生多种微生物培养物的实验,需要通过培养物进行鉴定从而帮助研究人员了解微生物组成、确定进一步研究的优先培养物以及获取“未培养”菌株。因此,高通量的鉴定方法对大规模培养实验尤为重要。

2.2.1 16S rRNA 基因扩增子测序

16S rRNA 基因扩增子测序是一种广泛使用的鉴定方法,可以用于检测样品中各微生物的相对丰度和菌群多样性,但只能精确到细菌属及属以上的分类水平,种及种以下水平的分类难以确认^[47]。16S rRNA 基因存在于所有细菌基因组中,包含 9 个可变区以及 10 个保守区可用于分类区分。针对这些保守区域设计通用引物进行扩增与测序,然后将测序数据上传至 NCBI 和 EzBiocloud 数据库进行比对,可得到细菌的分类信息。16S rRNA 扩增子测序对于初步鉴定存在于混合群落中的富集培养物十分有效^[38],但测序深度以及引物的选择会对结果造成一定的影响,不同测序区域比对的结果具有差异性,16S

rRNA 全长测序的准确性最高,且可用于构建系统发育树从而获取潜在新物种的大致分类信息。

2.2.2 全基因组测序

全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)是对一个生物体的基因组进行完整或接近完整测序的过程。细菌全基因组测序正在成为临床诊断和公共卫生实验室中广泛使用的技术, WGS 可提供比 16S rRNA 基因扩增子测序更高的核苷酸分辨率从而解析细菌菌株,可以根据包括抗生素耐药性、分子流行病学和毒力在内的特性对细菌病原体进行高分辨率表征。另外,收集基因组变异的信息,有助于了解菌株的基因组进化、适应动态和发病机制,从而开发即时诊断技术、药物和疫苗^[48]。有研究表明, WGS 改进了培养细菌的鉴定,并且观察到的表型和预测的抗微生物敏感之间几乎完全一致^[49]。但快速可靠的生物信息学工具的可用性依然是实现快速鉴定的主要瓶颈。

2.2.3 MALDI-TOF 质谱

MALDI-TOF 质谱法是一种利用表型进行分类鉴定的方法。与传统最快速的细菌表型鉴定方法相比,使用 MALDI-TOF MS 可显著缩短细菌鉴定时间,并显著降低成本^[50]。MALDI-TOF MS 是目前最具时效性且具有成本效益的用于微生物培养研究的鉴定方法。MALDI-TOF 质谱非常敏感,只需要相对较少的样本量即可检测到“多肽指纹图谱”并进行分类鉴定^[51]。但是目前 MALDI-TOF 质谱主要用于临床或食品相关环境微生物的识别,其数据库不适合用于肠道微生物培养分离物的鉴定。事实上,如上述提到的 Lagier 等^[39]建立的“培养组学”方法为 MALDI-TOF 肠道微生物数据库的建立做出了一定的贡献。也有研究^[52]应用 MALDI-TOF 质谱法成功在艰难梭菌感染患者及健康个体的粪便样本中通过高通量培养分别

鉴定到了 170 种和 275 种细菌。随着微生物数据库的扩充, MALDI-TOF 质谱法有望成为肠道微生物大规模分离培养实验的分类识别平台。

2.2.4 拉曼光谱

拉曼光谱是一种新型的鉴定方法^[53],具有高敏感性、不易损伤细胞及检测快速等特点,其鉴定过程与 MALDI-TOF 质谱法类似,但相较于 MALDI-TOF 质谱具有可检测混合微生物的优点。但目前拉曼光谱在肠道微生物的应用还处在开发阶段,其准确性还不稳定,需要建立更大的数据库并优化鉴定算法。

2.3 命名方法

目前,国际公认的微生物命名规则是通过《国际原核生物命名规则》确定的,并由国际原核生物系统学委员会(International Committee on Prokaryotic Systematics, ICSP)负责更新和实施。想要实现新分类群的有效命名,须在 ICSP 的官方出版物《国际系统和进化微生物学杂志》(International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, IJSEM)上发表一篇描述新分类群的原始论文且至少可从 2 个不同国家的培养物收藏中心中获取新物种。当原始论文是在其他期刊发表时,则需要向 IJSEM 编辑部提供出版物的副本从而对新分类群进行验证。由于该命名规则复杂,许多新培养的肠道微生物在 IJSEM 以外的期刊发表后,并未进一步通过 IJSEM 验证新分类群的有效性^[54]。例如, culturomics 在 2016 年报道了 247 个新分类群^[39],但因为它们的分类描述和命名不符合国际原核生物命名法(ICNP)^[55]的要求,其中有 117 个直到现在仍未分类。对于没有有效描述的新分离的分类群,即使它们已发表,它们的分类名称也不能得到 ICSP 的有效批准,其分类信息连同 16S rRNA 基因序列也不能被权威的 16S rRNA 基因

序列数据库[如: EZBioCloud^[56]、NCBI^[57]和 SILVA All-species Living Tree Project (LTP)^[58]等]收录。因此,在不同的培养研究中,一些微生物被反复声称是新类群。例如,2016年首次培养的54个微生物类群^[20]在2019年的工作中仍然被描述为新类群^[18]。新培养的分类群缺乏有效的分类学描述和命名,使得研究人员对新微生物的科学论述变得复杂化,并阻碍了世界各地科学界对细菌培养物的交流^[59-60]。因此,及时地鉴定和命名新的细菌分离株具有重要的实际意义。

2.4 保存方法

微生物资源的保存和维护技术包括在新鲜培养基上进行继代培养、在明胶盘上保存、在矿物油、硅胶中储存以及喷雾干燥、冻干保存等。根据世界培养物保藏联盟(World Alliance for the Collection of Cultures, WFCC)的指南,应至少采用2种技术来保存每种微生物培养物的菌株库(主库和工作库)。另外,为了降低意外损失的风险,需要在不同的地方建立备份存储。最好采用不同的保存技术,尽可能减少代谢活性,以保证培养物长期保持稳定。低温和冻干保存被认为是长期保存各种生物资源的最有价值且最可靠的方法,但冷却和干燥都可能损伤细胞从而导致培养物的活力降低甚至保存失败^[61]。因此,必须根据不同微生物的特征来设置不同的保存参数,例如,合适的悬浮培养基、细胞浓度、保护剂种类和冷却速率等^[62]。一般来说,冻干保存是运输和储存微生物培养物的首选方法,因为相比于其他的保存技术,冻干保存具有完全密封、可防止污染等优势。此外,还必须评估保存的生物材料的活力、纯度和稳定性并对保存方案进行验证,确保该保存方案具有可重复性和可靠性。因为所采用的保存技术可能会导致培养物的重要特性被意外地改变甚至失去^[63],严重威胁到在不同培养物保藏中心中保存的菌株副本的构建。因此,

保存过程中需要基于形态学、生理学、代谢基础和DNA分析对培养物进行广泛的保存前和保存后表征。

3 人、小鼠、猪的肠道微生物培养进展与应用

近年来,人类、小鼠以及猪的肠道微生物分离培养工作取得了重要的进展^[4,20,64-65],对于肠道微生物研究具有重要作用:(1)大规模分离培养细菌等微生物,可构建菌株资源库,揭示培养的微生物多样性;(2)培养组与宏基因组联用可弥补宏基因组测序的不足^[66];(3)培养获得的菌株可用于潜在的益生菌的挖掘与生物技术的开发;(4)通过体外和体内实验可进行功能验证及因果机制解析。

3.1 增加菌株资源

肠道微生物与健康息息相关,目前大部分肠道微生物研究集中于人类当中。在2010年,研究者通过人类微生物组计划(human microbiome project, HMP)构建了人类微生物组的参考基因组目录,其中肠道微生物基因组有437个^[67]。在此之后,肠道菌群的培养研究走向了复兴,不少研究通过高通量培养人类肠道样本获取相应的菌株资源。2011年,Goodman等^[21]使用简单的厌氧培养条件,基于高通量培养方法成功获取到4个门48个种的1172株微生物,并用于分析不同微生物对营养物质利用的差异。2012年,Lagier等^[19]在2年内,使用212种条件对3份粪便样本中的细菌进行培养,总共获得340种细菌,其中174种是人类肠道中未曾报道过的。而截止至2015年,在人类样本中已分离到12个门的2172种微生物,其中严格厌氧菌有386种,且主要从人类肠道中分离培养获得(244种,63%),表明在人类肠道微生物中存在许多可培养微生

物^[68]。2016年, Browne等^[20]结合大规模全基因组测序、系统发育分析和靶向表型培养(通过乙醇诱导处理形成孢子)设计了一个新的工作流程,发现大部分的肠道细菌是可培养的,成功分离出137种细菌。同年, Lagier等^[39]基于“培养组学”方法成功鉴定到1 057种细菌,为人类肠道库增加了531种新分离物,并提出了18种最佳培养条件。2019年,微生物研究领域发表了多项关于人类菌株资源库的研究成果,(1) Broad Institute-OpenBiome 微生物组库^[16] (Broad Institute-OpenBiome Microbiome Library, BIO-ML), 包含的7 758株肠道细菌分离物;(2) 人类胃肠道细菌培养物保藏中心(human gastrointestinal bacterial culture collection, HBC)^[23], 包含的737个全基因组测序细菌分离物;(3) 可培养基因组参考(culturable genomic references, CGR)^[18], 收集的1 520种菌株。最近, Liu等^[69]对来自中国健康志愿者的239份新鲜粪便样本进行大规模培养,构建了人类肠道微生物库(human gut microbiota, hGMB), 成功鉴定了10 558株分离株,并保藏了代表400个不同物种的1 170株菌株。经过多年的发展,可培养的人类肠道微生物资源不断扩充,预估“未培养”的人类胃肠道微生物已从80%^[70]至少降为70%^[69]。

小鼠被广泛用于人类医学研究的生物模型,详细研究其肠道中定殖的微生物的多样性和功能将十分重要。Lagkouravdos等^[64]建立了一个来自小鼠肠道的细菌菌株和其相关基因组的公共存储库——小鼠肠道细菌集合(mouse intestinal bacterial collection, miBC),该集合包含100个菌株,来自26个科的76个不同物种,作者将该集合用于菌株定殖特异性和序列相关性研究。事实上,miBC在物种水平上仅回收了不到10%的小鼠肠道微生物组,小鼠肠道微生物的分离培养还有很大空间。当研究人员需要进行病因研究或菌株特

异性干预实验时,也常受限于实体菌株的缺失。最近, Liu等^[71]对模型小鼠中的肠道微生物进行广泛培养和表征,构建了1个小鼠肠道微生物生物库(mouse gut microbial biobank, mGMB),该生物库包含126个物种的244个菌株,其中有22和17个物种分别在ob/ob和野生型C57BL/6J小鼠盲肠样本中显著富集。这些工作将有助于微生物定殖和分子研究以及微生物-宿主相互作用的机制解析。

猪既是人类疾病的优秀生物医学模型,又是重要的动物蛋白来源。近年来,在猪肠道微生物研究中,使用宏基因组分析方法取得了实质性进展,但相比于人类和小鼠肠道微生物,对猪肠道微生物群的可培养性知之甚少。Wylensek等^[65]在猪粪便样本中分离培养约1 100种细菌纯培养物,作者基于MALDI-TOF和16S rRNA基因序列共鉴定到9个门40个科的110个物种,其中包括22个新种和16个新属,建立了“猪肠道细菌集合”(pig intestinal bacterial collection, PiBAC),丰富了猪肠道菌群中可培养细菌种类。在另一研究中,研究者使用53种细菌培养方法对3头猪的哺乳期、断奶期、生长期和育肥期的肠道内容物进行了高通量培养,成功构建了不同生长阶段的可培养菌株参考图谱,显示了特定细菌类群的首选培养条件;还将参考图谱用于潜在益生菌的分离,最终得到了148种细菌的1 299个菌株^[72]。事实上,培养感兴趣的细菌菌株,了解微生物在养猪生产中的作用至关重要。在针对特定微生物的培养研究中, Wu等^[73]发现猪盲肠中丹毒丝菌科菌株的丰度与N-乙酰半乳糖胺(N-acetylgalactosamine, GalNAc)的浓度有关,通过使用10种不同的市售培养基,成功地从健康的猪粪便中分离出了5种丹毒科菌株,丰富了丹毒科的培养菌株,而且为进一步研究丹毒科在宿主表型中的功能作用提供了丹毒科菌株的基因

组信息。总之,随着培养技术的不断提升,建立了不同物种的肠道菌株资源库,成功揭示了肠道菌群中可培养菌的多样性,并推进了肠道微生物的研究与应用。

3.2 推进高通量测序研究

目前肠道微生物研究的主要方法为 16S rRNA 基因测序和宏基因组测序^[74]。16S rRNA 基因测序可以表征细菌和古菌的分类组成并检测微生物群落的结构变化^[75]。但即使在同一种内的菌株之间也存在生物学相关的表型差异^[76],而这些差异通常不能通过扩增子测序来区分。宏基因组测序能评估微生物的基因组内容,并实现微生物分类和功能分配^[77],但宏基因组测序也存在一定的不足^[74,78],例如无法检测低丰度细菌且存在深度偏差^[79-80]。而来自宏基因组组装的基因组与从纯培养物中生成的高质量参考基因组不同^[81],宏基因组组装的基因组是不完整的,有许多未组装的序列成为微生物暗物质。最重要的是,这些方法不能提供微生物纯培养物,而纯培养物对进一步研究菌株特性、体外模型构建、潜在机制解析和菌株开发应用极为重要^[4]。

人类肠道微生物群的比对、注释和功能表征需要全面、高质量的参考基因组。人类胃肠统一基因组(UHGG)集合,包括 4 644 个肠道原核生物的 204 938 个非冗余基因组,这些基因组编码了超过 1.7 亿个蛋白质序列整合在人类胃肠道蛋白(unified human gastrointestinal protein, UHGP)目录中。在这 2 个数据集中,有超过 70%的 UHGG 物种属于未培养物种,40%的 UHGP 缺乏功能注释^[7]。目前想要解决这一问题的最直接的办法便是获取细菌培养物,通过单菌株获取高质量基因组用于宏基因组分析比对注释。事实上,在人类研究中发现,分别使用培养组学和宏基因组学这两种方法时,只有 15%的细菌种类能够

同时被检测到^[66]。因此,结合 2 种方法可使比对率大幅提升,例如 Zou 等^[18]培养分离并构建了由 1 520 个细菌高质量基因组组成的可培养基因组参考(CGR),参考细菌基因组数量的增加将宏基因组测序 reads 的比对率从 50%提高到了 70%以上,以更高分辨率描述了人类肠道微生物组。最近,人类胃肠道细菌培养物保藏中心(HBC)公布了其包含的 273 个物种的 737 个全基因组测序细菌基因组^[23]。HBC 将人类胃肠道微生物群的细菌基因组数量提升了 37%,由此产生的全球人类胃肠道细菌基因组集合(human gastrointestinal microbiota genome collection, HGG)使宏基因组测序数据中属水平的比对率比用人类微生物组计划(HMP)基因组比对的结果提高了 61%,并实现了近 50%序列的亚种级分类^[23]。胃肠道细菌参考序列资源的改进避免了对宏基因组从头组装的依赖,通过微生物纯培养对鉴定的基因进行功能验证,将大大提高注释范围和准确性,从而进一步提高未培养微生物的可培养性。

在小鼠肠道微生物研究中,菌株资源库为基因研究提供了基础,提高了小鼠肠道宏基因组学分析的分辨率。例如,在小鼠菌株库 mGMB 中,有 77 个新物种在小鼠肠道中普遍存在,将这 77 个新物种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列补充原来的 LTP 数据库,并使用补充后的数据库重新注释扩增子数据集,结果发现序列数据集属水平的注释率从 33.43%±9.52%增加到了 49.46%±9.54%,物种水平的注释率从 12.98%±5.07%增加到了 24.37%±6.60%^[71]。

猪综合基因目录(pig integrated gene catalog, PIGC)是最近扩展的猪肠道微生物基因集,包含 1 700 万个完整基因,为猪肠道微生物组研究提供了扩展资源^[82]。该基因集以 90%的蛋白质同一性聚类后发现,28%是未知蛋白质,在 2 673 个

物种级基因组箱 (species-level genome bins, SGBs) 中也有 86% 是未知的, 表明猪肠道微生物分析迫切需要高质量基因组来提升比对率和注释率, 通过纯培养物产生基因组或许是一种有效的办法。最近, Wylensek 等^[65]也注意到猪肠道菌群的大多数高质量宏基因组组装基因组 (high-quality metagenome-assembled genomes, hqMAGs) 属于未知分类群, 将“猪肠道细菌集合”(PiBAC) 中的培养物基因组与 hqMAG 对比后发现培养物基因组可有力补充 hqMAG。另外, 在仔猪肠道微生物组的研究中也发现培养组学和宏基因组学这两种策略获取的参考基因组存在重大偏差, 表明综合两类基因组资源或许是全面描述猪肠道的微生物组成和功能的前提^[83]。总之, 为了进一步了解肠道微生物组成并分析和探索肠道微生物功能, 有必要明确培养组学在微生物研究方面与宏基因组学的互补性, 以及通过培养组学获取菌株资源, 提供高质量参考基因组来推进高通量测序研究的可行性。随着培养组学的发展, 分离的菌株将更好地揭示细菌的分类和功能多样性, 也将为微生物与宿主相互作用的机制研究和应用开辟途径。

3.3 助力益生菌的挖掘与生物技术开发

培养研究中获得的菌株资源增加了后续体外和体内试验可选菌株的范围, 为发现具有益生菌潜力的菌株创造了更多的机会。在健康哺乳动物的肠道中 99% 以上的菌群都是共生菌, 其中有许多有益菌, 具有分解碳水化合物^[84]、合成 B 族维生素^[85-86]、产生短链脂肪酸^[87]等功能, 与宿主营养物质消化吸收^[88]、宿主免疫^[89]和代谢综合征^[90]等紧密相关。尽管许多细菌具备有益功能, 但是目前在物种水平的可用于食品的肠道益生菌种类还比较少, 大部分为双歧杆菌类和乳杆菌类。鉴于益生菌的重要作用以及应用现状, 许多研究者致力于分离新的益生菌, 这些细菌被

称为下一代益生菌。例如 *Akkermansia muciniphila* 是肠道粘液层中常见的定殖菌, 由于其体外和体内研究的生物学优势, 一直被认为是下一代益生菌的有希望的候选者。该菌于 2004 年第 1 次从人类粪便中分离^[91]。Patrice D. Cani 团队发现 *Akkermansia muciniphila* 能够缓解小鼠肥胖和 II 型糖尿病的发展, 并在随后的研究中进一步发现使用巴氏杀菌形式的 *Akkermansia* 可以比活细菌更好地降低如胰岛素抵抗、高胆固醇血症或脂肪储存等导致心血管疾病的风险^[92], 目前该菌处于临床试验阶段。

在畜牧业中, 益生菌被认为是抗生素生长促进剂的重要潜在替代品^[93]。在仔猪中, 益生菌已被证明可发挥与抗生素相似的促生长功能^[94], 并减少病原体^[95]在胃肠道中的定殖。例如 Xu 等^[96]从健康母猪粪便中成功分离了罗伊氏乳杆菌, 并发现由罗伊氏乳杆菌制备的益生菌添加剂可代替抗生素添加到日粮中, 用于预防仔猪腹泻, 增强仔猪抗病能力。另外, Chen 等^[97]利用实验猪的粪便样本成功分离和培养了 *Prevotella copri*, 并在无菌小鼠中使用活的 *Prevotella copri* 进行灌胃实验, 评估了分离的 *Prevotella copri* 与宿主脂肪沉积之间的因果关系, 证实了来自饲喂商业配方日粮的猪肠道微生物群中 *Prevotella copri* 丰度提高显著增加了猪的脂肪沉积。而在人类肠道中, *Prevotella copri* 的不同菌株具有显著不同的生物学功能且与饮食相关, 有的 *Prevotella copri* 菌株被认为是潜在的益生菌^[98]。这些研究都说明了通过微生物培养来分离潜在益生菌具有重要意义, 但益生效果和开发应用仍需更多的机制研究。

随着对肠道中宿主-微生物和微生物-微生物间相互作用的深入了解, 工程菌作为活性药物的应用也成为可能, 细菌生物传感器可以用来探索细菌的肠道生态位, 监测肠道健康^[99]。最近,

通过利用包括 CRISPR-Cas 技术在内的基因操作工具,已经构建了基于细菌的生物传感器,可以用作生物标志物检测特异的疾病^[100]。此外,肠道微生物与免疫系统之间具有密切的联系,肠道菌群分离物可在细菌疗法中发挥重要作用,为调节肠道菌群从而改善免疫疗法提供了一条新途径。在一项对照研究中^[101],研究人员利用 16S rRNA 测序结合培养组学从坏死性小肠结肠炎新生儿粪便中分离出了丁酸梭菌,进一步通过培养实验测试培养上清液的细胞毒活性以及检测分泌的毒素发现丁酸梭菌菌株产生的毒素与早产儿坏死性小肠结肠炎的发生存在紧密联系。因此,通过细菌疗法恢复共生肠道微生物群可能是治疗这种严重疾病的有效方法。坏死性小肠结肠炎影响高达 10% 的出生体重较低的新生儿,而肠道微生物的分离培养将对各种药物的研发起到很大的促进作用。细菌的天然产物及其衍生物是商业可用药物的重要来源,肠道微生物培养有望促进抗生素替代品的开发,从而解决抗生素耐药的问题。总之,在今后的细菌培养中,有可能发现新的微生物诊断标志物,从而提供早期诊断技术和新的治疗方法,有希望识别更多的益生菌并扩大微生物的开发应用。

3.4 促进功能验证及因果机制阐明

将单菌、多菌或菌群移植^[102]到无菌小鼠体内,通过模型小鼠直接研究细菌和表型的因果关系,是研究、筛选、评价细菌功能的重要方法。事实上,不同个体的肠道菌群组成各不相同并且与健康密切相关,宿主的遗传变异是否影响、如何影响其自身的肠道菌群组成是一个国际研究热点及难点。由于受到环境、饮食、健康状况以及宿主遗传变异的多重影响,许多研究(尤其是在人类中的研究)难以被重复,而猪作为拥有与人类大小相当的杂食性单胃动物,可作为破译肠道微生物群遗传结构的良好动物模型。近期,黄

路生院士团队以家猪为研究材料,分析了超过 1 000 头猪在不同年龄和解剖位置的肠道微生物群组^[103],通过对 F6 及 F7 两个世代大样本家猪的系统遗传解析,鉴别到了家猪 ABO 血型系统中一个 350 万年前包含第 8 外显子的 2.3 kb 缺失变异,这个基因的缺失变异直接导致了家猪肠道中丹毒丝菌科相关细菌的丰度差异。随后,该团队从家猪中分离培养了 2 株与受 ABO 血型基因影响的丹毒丝菌科相关细菌的 16S rRNA 基因序列相似性达到 100% 及 99.8% 的菌株,发现在体外培养基中添加糖胺可促进目标丹毒丝菌科菌株的生长,使用 C¹³ 标记的 GalNAc 饲喂体外培养的受 ABO 血型影响的丹毒丝菌科菌株,进一步证实了受 ABO 血型影响的丹毒丝菌科菌株能够利用 GalNAc。而无菌小鼠灌喂实验也证实,添加 GalNAc 促进了目标丹毒丝菌科菌株的生长^[103]。最终的系统研究清晰地探明了宿主基因组因突变位点影响肠道丹毒丝菌丰度的机制: ABO 基因 2.3 kb 的缺失(O 型血个体)导致编码的蛋白质无 N-乙酰半乳糖胺转移酶活性,因此无法把 GalNAc 添加到肠道黏液中高度糖基化的黏蛋白上,导致 OO 基因型个体肠道中 GalNAc 浓度降低,从而影响依赖 GalNAc 作为碳源的细菌的生长^[103]。总之,获取纯培养物是开发生物技术、了解生物体生理学和基因组学以及验证分子数据中出现的假设的先决条件,通过微生物培养工作来挖掘具有重要作用的微生物,为分析肠道菌株对宿主表型影响的因果关系和应用研究奠定了良好的基础。

4 讨论与展望

肠道微生物的培养可以扩大肠道菌种资源,进一步增加对生态系统中微生物功能的认识并使微生物得到合理的开发利用。得益于菌种资源的获取,高通量数据可以进一步精准解析和深度

挖掘,潜在的益生菌可以进一步发掘利用,肠道菌群与宿主的相互作用分子机制可通过体内体外实验进行解析,最终达到精准调控肠道菌群从而治疗疾病的目的。但是,由于微生物生态系统的总体多样性仍然难以评估,目前估计仍有 70% 的肠道微生物物种还没有合适的条件在实验室培养,想要更详尽和准确地了解哺乳动物肠道中的微生物群落还需要更多深入的研究。尽管创新的培养方法正在不断发展,但其广泛应用还需要克服一些挑战,传统的梯度稀释平板涂布法估计还会在肠道微生物培养研究中持续主导一段时间。另外,肠道微生物群落的空间分布对微生物培养来说仍是一个挑战:用粪便作为研究材料的经典研究通常会错过一些在不同部位定殖的特定细菌。虽然上面提到的文献综述并不详尽,但是结合目前的发展状况可清楚地表明,培养是肠道微生物研究中必不可少的环节,培养分离物对肠道微生物的深入研究至关重要。

当然,创新的培养技术和分子工具是全面了解肠道微生物群落的基础,二者相辅相成,都应当得到足够的重视。众所周知,不同的菌株可能具有非常不同的表型,微生物遗传信息的快速交换导致了环境中动态的微生物功能,高通量测序检测到的菌株变异是否确实与相关的功能变化有关,还有待体外培养实验证明。因此,创建旨在捕获尽可能多物种的菌群集合是一个很好的起点。此外,由于目前的命名规则较为复杂,许多研究者不愿对分离的微生物进行命名,菌株库数据得不到及时有效的更新,甚至当研究者离开岗位以后,相应的菌株和生物学知识也可能随之丢失,这些都阻碍了基于培养的研究成果的共享。因此,未来的工作应该包括将菌株的命名规则在规范的基础上进行简化并优化保存方法使菌株存档扩展到每个物种的多个菌株,以便加强相互交流以及进一步充分利用这些菌株来研究微生

物功能和进化。另外,开发能控制培养条件、对微生物生长自动检测、对菌株自动识别的小型化装置以及完善参考数据库、简化培养步骤、发展新的培养技术,并缩短新物种从分离到发表的时间对于扩大肠道微生物培养资源的应用深度和广度都有极大的帮助。总之,纯菌株是微生物研究的重要生物资源,不仅能为生物产业或健康产业提供益生菌挖掘以及生物技术开发的菌株实体;还可用于构建参考基因组,提高基因注释的准确性,联合宏基因组、宏代谢组及宏转录组数据可进一步解析微生物群落的功能并通过体内及体外实验推进因果机理解析。希望在今后的肠道微生物培养工作中,有效分离更多的“未培养”肠道微生物,进一步促进微生物研究领域的发展,为维护宿主健康贡献力量!

致谢

诚挚感谢江西农业大学黄路生院士对本论文写作的指导和建议!

参考文献

- [1] ROOKS MG, GARRETT WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16(6): 341-352.
- [2] TILG H, ZMORA N, ADOLPH TE, ELINAV E. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2020, 20(1): 40-54.
- [3] OSADCHIY V, MARTIN CR, MAYER EA. The gut-brain axis and the microbiome: mechanisms and clinical implications[J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2019, 17(2): 322-332.
- [4] 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: 540-550.

- [5] HEINTZ-BUSCHART A, WILMES P. Human gut microbiome: function matters[J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(7): 563-574.
- [6] THOMAS AM, SEGATA N. Multiple levels of the unknown in microbiome research[J]. BMC Biology, 2019, 17(1): 48.
- [7] ALMEIDA A, NAYFACH S, BOLAND M, STROZZI F, BERACOCHEA M, SHI ZJ, POLLARD KS, SAKHAROVA E, PARKS DH, HUGENHOLTZ P, SEGATA N, KYRPIDES NC, FINN RD. A unified catalog of 204, 938 reference genomes from the human gut microbiome[J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(1): 105-114.
- [8] RINKE C, SCHWIENTEK P, SCZYRBA A, IVANOVA NN, ANDERSON IJ, CHENG JF, DARLING A, MALFATTI S, SWAN BK, GIES EA, DODSWORTH JA, HEDLUND BP, TSIAMIS G, SIEVERT SM, LIU WT, EISEN JA, HALLAM SJ, KYRPIDES NC, STEPANAUSKAS R, RUBIN EM, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter[J]. Nature, 2013, 499(7459): 431-437.
- [9] PEISL BYL, SCHYMANSKI EL, WILMES P. Dark matter in host-microbiome metabolomics: tackling the unknowns-a review[J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1037: 13-27.
- [10] LIN LY, WU QY, SONG J, DU YH, GAO J, SONG YL, WANG W, YANG CY. Revealing the *in vivo* growth and division patterns of mouse gut bacteria[J]. Science Advances, 2020, 6(36): eabb2531.
- [11] MALLICK H, MA SY, FRANZOSA EA, VATANEN T, MORGAN XC, HUTTENHOWER C. Experimental design and quantitative analysis of microbial community multiomics[J]. Genome Biology, 2017, 18(1): 228.
- [12] UGARTE A, VICEDOMINI R, BERNARDES J, CARBONE A. A multi-source domain annotation pipeline for quantitative metagenomic and metatranscriptomic functional profiling[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 149.
- [13] TRAMONTANO M, ANDREJEV S, PRUTEANU M, KLÜNEMANN M, KUHN M, GALARDINI M, JOUHTEEN P, ZELEDZNIAK A, ZELLER G, BORK P, TYPAS A, PATIL KR. Nutritional preferences of human gut bacteria reveal their metabolic idiosyncrasies[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(4): 514-522.
- [14] STRANDWITZ P, KIM KH, TEREKHOVA D, LIU JK, SHARMA A, LEVERING J, MCDONALD D, DIETRICH D, RAMADHAR TR, LEKBUA A, MROUE N, LISTON C, STEWART EJ, DUBIN MJ, ZENGLER K, KNIGHT R, GILBERT JA, CLARDY J, LEWIS K. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota[J]. Nature Microbiology, 2019, 4(3): 396-403.
- [15] LI LY, ABOU-SAMRA E, NING ZB, ZHANG X, MAYNE J, WANG J, CHENG K, WALKER K, STINTZI A, FIGEYS D. An *in vitro* model maintaining taxon-specific functional activities of the gut microbiome[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4146.
- [16] PPOYET M, GROUSSIN M, GIBBONS SM, AVILA-PACHECO J, JIANG X, KEARNEY SM, PERROTTA AR, BERDY B, ZHAO S, LIEBERMAN TD, SWANSON PK, SMITH M, ROESEMANN S, ALEXANDER JE, RICH SA, LIVNY J, VLAMAKIS H, CLISH C, BULLOCK K, DEIK A, et al. A library of human gut bacterial isolates paired with longitudinal multiomics data enables mechanistic microbiome research[J]. Nature Medicine, 2019, 25(9): 1442-1452.
- [17] VILANOVA C, PORCAR M. Are multi-omics enough?[J]. Nature Microbiology, 2016, 1: 16101.
- [18] ZOU YQ, XUE WB, LUO GW, DENG ZQ, QIN PP, GUO RJ, SUN HP, XIA Y, LIANG SS, DAI Y, WAN DW, JIANG RR, SU LL, FENG Q, JIE ZY, GUO TK, XIA ZK, LIU C, YU JH, LIN YX, et al. 1 520 reference genomes from cultivated human gut bacteria enable functional microbiome analyses[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(2): 179-185.
- [19] 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[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2012, 18(12): 1185-1193.
- [20] BROWNE HP, FORSTER SC, ANONYE BO, KUMAR N, NEVILLE BA, STARES MD, GOULDING D, LAWLEY TD. Culturing of

- “unculturable” human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation[J]. *Nature*, 2016, 533(7604): 543-546.
- [21] GOODMAN AL, KALLSTROM G, FAITH JJ, REYES A, MOORE A, DANTAS G, GORDON JI. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(15): 6252-6257.
- [22] LAU JT, WHELAN FJ, HERATH I, LEE CH, COLLINS SM, BERCIK P, SURETTE MG. Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling[J]. *Genome Medicine*, 2016, 8(1): 72.
- [23] FORSTER SC, KUMAR N, ANONYE BO, ALMEIDA A, VICIANI E, STARES MD, DUNN M, MKANDAWIRE TT, ZHU AN, SHAO Y, PIKE LJ, LOUIE T, BROWNE HP, MITCHELL AL, NEVILLE BA, FINN RD, LAWLEY TD. A human gut bacterial genome and culture collection for improved metagenomic analyses[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(2): 186-192.
- [24] SORBARA MT, LITTMANN ER, FONTANA E, MOODY TU, KOHOUT CE, GJONBALAJ M, EATON V, SEOK R, LEINER IM, PAMER EG. Functional and genomic variation between human-derived isolates of *Lachnospiraceae* reveals inter- and intra-species diversity[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(1): 134-146.e4.
- [25] STALEY JT, KONOPKA A. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1985, 39: 321-346.
- [26] OVERMANN J. Principles of enrichment, isolation, cultivation, and preservation of prokaryotes[J]. *The Prokaryotes*. 2006, 1: 80-136.
- [27] LYNCH MDJ, NEUFELD JD. Ecology and exploration of the rare biosphere[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(4): 217-229.
- [28] ZHENG WS, ZHAO SJ, YIN YH, ZHANG HD, NEEDHAM DM, EVANS ED, DAI CL, LU PJ, ALM EJ, WEITZ DA. High-throughput, single-microbe genomics with strain resolution, applied to a human gut microbiome[J]. *Science*, 2022, 376(6597): eabm1483.
- [29] BARTELME RP, CUSTER JM, DUPONT CL, ESPINOZA JL, TORRALBA M, KHALILI B, CARINI P. Influence of substrate concentration on the culturability of heterotrophic soil microbes isolated by high-throughput dilution-to-extinction cultivation[J]. *mSphere*, 2020, 5(1): e00024-e00020.
- [30] LENNON JT, JONES SE. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(2): 119-130.
- [31] DWORKIN J, SHAH IM. Exit from dormancy in microbial organisms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(12): 890-896.
- [32] 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.
- [33] ZENGLER K, ZARAMELA LS. The social network of microorganisms—how auxotrophies shape complex communities[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(6): 383-390.
- [34] GUZMAN JLL, SOUSA DZ, ANGENENT LT. Development of a bioelectrochemical system as a tool to enrich H₂-producing syntrophic bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 110.
- [35] STIEB M, SCHINK B. Cultivation of syntrophic anaerobic bacteria in membrane-separated culture devices[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1987, 45(2): 71-76.
- [36] STARR MP, STOLP H, TRÜPER HG, BALOWS A, SCHLEGEL HG. *The Prokaryotes*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1981.
- [37] 杜梦璇, 姜民志, 刘畅, 刘双江. 肠道微生物菌株资源库的构建与应用开发[J]. *微生物学报*, 2021, 61(4): 875-890.
- DU MX, JIANG MZ, LIU C, LIU SJ. Gut microbial BioBanks: construction and applications[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(4): 875-890 (in Chinese).

- [38] RETTEDAL EA, GUMPERT H, SOMMER MOA. Cultivation-based multiplex phenotyping of human gut microbiota allows targeted recovery of previously uncultured bacteria[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4714.
- [39] 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(12): 16203.
- [40] DIONE N, KHELAIFIA S, SCOLA BL, LAGIER JC, RAOULT D. A quasi-universal medium to break the aerobic/anaerobic bacterial culture dichotomy in clinical microbiology[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(1): 53-58.
- [41] MA L, KIM J, HATZENPICHLER R, KARYMOV MA, HUBERT N, HANAN IM, CHANG EB, ISMAGILOV RF. Gene-targeted microfluidic cultivation validated by isolation of a gut bacterium listed in Human Microbiome Project's Most Wanted taxa[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(27): 9768-9773.
- [42] VILLA MM, BLOOM RJ, SILVERMAN JD, DURAND HK, JIANG S, WU AC, DALLOW EP, HUANG SQ, YOU LC, DAVID LA. Interindividual variation in dietary carbohydrate metabolism by gut bacteria revealed with droplet microfluidic culture[J]. *mSystems*, 2020, 5(3): e00864-e00819.
- [43] KAEBERLEIN T, LEWIS K, EPSTEIN SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1127-1129.
- [44] 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.
- [45] TANAKA Y, BENNO Y. Application of a single-colony coculture technique to the isolation of hitherto unculturable gut bacteria[J]. *Microbiology and Immunology*, 2015, 59(2): 63-70.
- [46] CROSS KL, CAMPBELL JH, BALACHANDRAN M, CAMPBELL AG, COOPER CJ, GRIFFEN A, HEATON M, JOSHI S, KLINGEMAN D, LEYS E, YANG ZM, PARKS JM, PODAR M. Targeted isolation and cultivation of uncultivated bacteria by reverse genomics[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(11): 1314-1321.
- [47] 周梦情, 陈从英. 猪肠道细菌培养组学研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(5): 1186-1194.
ZHOU MQ, CHEN CY. Research progress on intestinal bacteria culturomics of pigs[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(5): 1186-1194 (in Chinese).
- [48] WAN MAKHTAR WRW, BHARUDIN I, SAMSULRIZAL NH, YUSOF NY. Whole genome sequencing analysis of *Salmonella enterica* serovar typhi: history and current approaches[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(10): 2155.
- [49] ZHOU K, LOKATE M, DEURENBERG RH, ARENDS J, LO-TENFOE J, GRUNDMANN H, ROSSEN JWA, FRIEDRICH AW. Characterization of a CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak strain assigned to a novel sequence type (1427)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1250.
- [50] SENG P, DRANCOURT M, GOURIET F, la SCOLA B, FOURNIER PE, ROLAIN JM, RAOULT D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 49(4): 543-551.
- [51] DUMOLIN C, AERTS M, VERHEYDE B, SCHELLAERT S, VANDAMME T, van der JEUGT F, de CANCK E, Cnockaert M, Wieme AD, Cleenwerck I, Peiren J, Dawyndt P, Vandamme P, Carlier A. Introducing SPeDE: high-throughput dereplication and accurate determination of microbial diversity from matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry data[J]. *mSystems*, 2019, 4(5): e00437-e00419.
- [52] AMRANE S, HOCQUART M, AFOUDA P, KUETE E, PHAM TPT, DIONE N, NGOM II, VALLES C, BACHAR D, RAOULT D, LAGIER JC. Metagenomic

- and culturomic analysis of gut microbiota dysbiosis during *Clostridium difficile* infection[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 12807.
- [53] HUANG WE, GRIFFITHS RI, THOMPSON IP, BAILEY MJ, WHITELEY AS. Raman microscopic analysis of single microbial cells[J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(15): 4452-4458.
- [54] OREN A, GARRITY GM, PARTE AC. Why are so many effectively published names of prokaryotic taxa never validated?[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(7): 2125-2129.
- [55] GARRITY GM, PARKER CT, TINDALL BJ. International code of nomenclature of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(1A): S1-S111.
- [56] YOON SH, HA SM, KWON S, LIM J, KIM Y, SEO H, CHUN J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [57] FEDERHEN S. The NCBI taxonomy database[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 40(D1): D136-D143.
- [58] YILMAZ P, PARFREY LW, YARZA P, GERKEN J, PRUESSE E, QUAST C, SCHWEER T, PEPLIES J, LUDWIG W, GLÖCKNER FO. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 42(D1): D643-D648.
- [59] MURRAY AE, FREUDENSTEIN J, GRIBALDO S, HATZENPICHLE R, HUGENHOLTZ P, KÄMPFER P, KONSTANTINIDIS KT, LANE CE, PAPKE RT, PARKS DH, ROSSELLO-MORA R, STOTT MB, SUTCLIFFE IC, THRASH JC, VENTER SN, WHITMAN WB, ACINAS SG, AMANN RI, ANANTHARAMAN K, ARMENGAUD J, et al. Roadmap for naming uncultivated archaea and bacteria[J]. Nature Microbiology, 2020, 5(8): 987-994.
- [60] YOUNG JM. Legitimacy is an essential concept of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes—a major revision of the code is called for[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(pt 5): 1252-1257.
- [61] D’ELIA L, del MONDO A, SANTORO M, de NATALE A, Pinto G, Pollio A. Microorganisms from harsh and extreme environments: a collection of living strains at ACUF (Naples, Italy)[J]. Ecological Questions, 2018, 29(3): 1.
- [62] SMITH D, RYAN M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms[J]. The Scientific World Journal, 2012, 2012: 805659.
- [63] BECKER P, BOSSCHAERTS M, CHAERLE P, DANIEL HM, HELLEMANS A, OLBRECHTS A, RIGOUTS L, WILMOTTE A, HENDRICKX M. Public microbial resource centers: key hubs for findable, accessible, interoperable, and reusable (FAIR) microorganisms and genetic materials[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(21): e01444-e01419.
- [64] LAGKOUVARDOS I, PUKALL R, ABT B, FOESEL BU, MEIER-KOLTHOFF JP, KUMAR N, BRESCIANI A, MARTÍNEZ I, JUST S, ZIEGLER C, BRUGIROUX S, GARZETTI D, WENNING M, BUI TPN, WANG J, HUGENHOLTZ F, PLUGGE CM, PETERSON DA, HORNEF MW, BAINES JF, et al. The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota[J]. Nature Microbiology, 2016, 1: 16131.
- [65] WYLENSEK D, HITCH TCA, RIEDEL T, AFRIZAL A, KUMAR N, WORTMANN E, LIU TZ, DEVENDRAN S, LESKER TR, HERNÁNDEZ SB, HEINE V, BUHL EM, D’AGOSTINO PM, CUMBO F, FISCHÖDER T, WYSCHKON M, LOOFT T, PARREIRA VR, ABT B, DODEN HL, et al. A collection of bacterial isolates from the pig intestine reveals functional and taxonomic diversity[J]. Nature Communications, 2020, 11: 6389.
- [66] LAGIER JC, HUGON P, KHELAIKIA S, FOURNIER PE, la SCOLA B, RAOULT D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 28(1): 237-264.
- [67] HUMAN MICROBIOME JUMPSTART REFERENCE STRAINS CONSORTIUM, NELSON KE, WEINSTOCK GM, HIGHLANDER SK, WORLEY KC, CREASY HH, WORTMAN JR, RUSCH DB,

- MITREVA M, SODERGREN E, CHINWALLA AT, FELDGARDEN M, GEVERS D, HAAS BJ, MADUPU R, WARD DV, BIRREN BW, GIBBS RA, METHE B, PETROSINO JF, et al. A catalog of reference genomes from the human microbiome[J]. *Science*, 2010, 328(5981): 994-999.
- [68] HUGON P, DUFOUR JC, COLSON P, FOURNIER PE, SALLAH K, RAOULT D. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2015, 15(10): 1211-1219.
- [69] LIU C, DU MX, ABUDUAINI R, YU HY, LI DH, WANG YJ, ZHOU N, JIANG MZ, NIU PX, HAN SS, CHEN HH, SHI WY, WU LH, XIN YH, MA JC, ZHOU YG, JIANG CY, LIU HW, LIU SJ. Enlightening the taxonomy darkness of human gut microbiomes with a cultured biobank[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 119.
- [70] TURNBAUGH PJ, LEY RE, HAMADY M, FRASER-LIGGETT CM, KNIGHT R, GORDON JI. The human microbiome project[J]. *Nature*, 2007, 449(7164): 804-8100.
- [71] LIU C, ZHOU N, DU MX, SUN YT, WANG K, WANG YJ, LI DH, YU HY, SONG YQ, BAI BB, XIN YH, WU LH, JIANG CY, FENG J, XIANG H, ZHOU YG, MA JC, WANG J, LIU HW, LIU SJ. The mouse gut microbial biobank expands the coverage of cultured bacteria[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 79.
- [72] WANG XF, HOWE S, WEI XY, DENG FL, TSAI T, CHAI JM, XIAO YP, YANG H, MAXWELL CV, LI Y, ZHAO JC. Comprehensive cultivation of the swine gut microbiome reveals high bacterial diversity and guides bacterial isolation in pigs[J]. *mSystems*, 2021, 6(4): e0047721.
- [73] WU JY, LIU M, ZHOU MQ, WU L, YANG H, HUANG LS, CHEN CY. Isolation and genomic characterization of five novel strains of *Erysipelotrichaceae* from commercial pigs[J]. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1): 125.
- [74] JOVEL J, PATTERSON J, WANG WW, HOTTE N, O'KEEFE S, MITCHEL T, PERRY T, KAO DN, MASON AL, MADSEN KL, WONG GKS. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 459.
- [75] GOŁĘBIEWSKI M, TRETYN A. Generating amplicon reads for microbial community assessment with next-generation sequencing[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(2): 330-354.
- [76] KAMADA N, CHEN GY, INOHARA N, NÚÑEZ G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota[J]. *Nature Immunology*, 2013, 14(7): 685-690.
- [77] LLOYD-PRICE J, MAHURKAR A, RAHNAVAR D, CRABTREE J, ORVIS J, HALL AB, BRADY A, CREASY HH, MCCracken C, GIGLIO MG, MCDONALD D, FRANZOSA EA, KNIGHT R, WHITE O, HUTTENHOWER C. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project[J]. *Nature*, 2017, 550(7674): 61-66.
- [78] DHARIWAL A, CHONG J, HABIB S, KING IL, AGELLON LB, XIA JG. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W180-W188.
- [79] SINGH P, TEAL TK, MARSH TL, TIEDJE JM, MOSCI R, JERNIGAN K, ZELL A, NEWTON DW, SALIMNIA H, LEPHART P, SUNDIN D, KHALIFE W, BRITTON RA, RUDRIK JT, MANNING SD. Intestinal microbial communities associated with acute enteric infections and disease recovery[J]. *Microbiome*, 2015, 3: 45.
- [80] BESCUCCI DM, MOOTE PE, ORTEGA POLO R, UWIERA RRE, INGLIS GD. *Salmonella enterica* serovar typhimurium temporally modulates the enteric microbiota and host responses to overcome colonization resistance in swine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(21): e01569-e01520.
- [81] PARKS DH, IMELFORT M, SKENNERTON CT, HUGENHOLTZ P, TYSON GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes[J]. *Genome Research*, 2015, 25(7): 1043-1055.
- [82] CHEN CY, ZHOU YY, FU H, XIONG XW, FANG SM, JIANG H, WU JY, YANG H, GAO J, HUANG LS. Expanded catalog of microbial genes and

- metagenome-assembled genomes from the pig gut microbiome[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 1106.
- [83] DONG B, LIN XQ, JING XH, HU TY, ZHOU JW, CHEN JW, XIAO L, WANG B, CHEN Z, LIU J, HU YY, LIU GL, LIU SS, LIU JN, WEI WK, ZOU YQ. A bacterial genome and culture collection of gut microbial in weanling piglet[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(1): e0241721.
- [84] 段云峰, 蔡峰, 律娜, 朱宝利. 益生菌促进胃肠道健康的机制及应用[J]. *微生物学报*, 2022, 62(3): 836-847.
- DUAN YF, CAI F, LV N, ZHU BL. The mechanism and application of probiotics in promoting gastrointestinal health[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 836-847 (in Chinese).
- [85] KRAUTKRAMER KA, FAN J, BÄCKHED F. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(2): 77-94.
- [86] GUO H, CHOU WC, LAI YJ, LIANG KX, TAM JW, BRICKEY WJ, CHEN L, MONTGOMERY ND, LI X, BOHANNON LM, SUNG AD, CHAO NJ, PELED JU, GOMES ALC, van den BRINK MRM, FRENCH MJ, MACINTYRE AN, SEMPOWSKI GD, TAN XM, SARTOR RB, et al. Multi-omics analyses of radiation survivors identify radioprotective microbes and metabolites[J]. *Science*, 2020, 370(6516): eaay9097.
- [87] VISCONTI A, le ROY CI, ROSA F, ROSSI N, MARTIN TC, MOHNEY RP, LI WZ, de RINALDIS E, BELL JT, VENTER JC, NELSON KE, SPECTOR TD, FALCHI M. Interplay between the human gut microbiome and host metabolism[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4505.
- [88] SCHWALM ND III, GROISMAN EA. Navigating the gut buffet: control of polysaccharide utilization in *Bacteroides* spp.[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(12): 1005-1015.
- [89] KUGADAS A, WRIGHT Q, GEDDES-MCALISTER J, GADJEVA M. Role of microbiota in strengthening ocular mucosal barrier function through secretory IgA[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2017, 58(11): 4593-4600.
- [90] NATIVIDAD JM, AGUS A, PLANCHAIS J, LAMAS B, JARRY AC, MARTIN R, MICHEL ML, CHONG-NGUYEN C, ROUSSEL R, STRAUBE M, JEGOU S, MCQUITTY C, le GALL M, da COSTA G, LECORNET E, MICHAUDEL C, MODOUX M, GLODT J, SOKOL H. Impaired aryl hydrocarbon receptor ligand production by the gut microbiota is a key factor in metabolic syndrome[J]. *Cell Metabolism*, 2018, 28(5): 737-749.e4.
- [91] DERRIEN M, VAUGHAN EE, PLUGGE CM, de VOS WM. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(5): 1469-1476.
- [92] DEPOMMIER C, van HUL M, EVERARD A, DELZENNE NM, de VOS WM, CANI PD. Pasteurized *Akkermansia muciniphila* increases whole-body energy expenditure and fecal energy excretion in diet-induced obese mice[J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(5): 1231-1245.
- [93] HUYGHEBAERT G, DUCATELLE R, IMMERSEEL FV. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers[J]. *The Veterinary Journal*, 2011, 187(2): 182-188.
- [94] SHEN YB, PIAO XS, KIM SW, WANG L, LIU P, YOON I, ZHEN YG. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2009, 87(8): 2614-2624.
- [95] MØLBAK L, THOMSEN LE, JENSEN TK, BACH KNUDSEN KE, BOYE M. Increased amount of *Bifidobacterium thermacidophilum* and *Megasphaera elsdenii* in the colonic microbiota of pigs fed a swine dysentery preventive diet containing chicory roots and sweet lupine[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(5): 1853-1867.
- [96] XU S, CHENG JJ, MENG XC, XU Y, MU Y. Complete genome and comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* YSJL-12, a potential probiotics strain isolated from healthy sow fresh feces[J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2020, 16: 1176934320942192.
- [97] CHEN CY, FANG SM, WEI H, HE MZ, FU H, XIONG XW, ZHOU YY, WU JY, GAO J, YANG H, HUANG LS. *Prevotella copri* increases fat accumulation in pigs fed with formula diets[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1):

- 175.
- [98] TETT A, PASOLLI E, MASETTI G, ERCOLINI D, SEGATA N. *Prevotella* diversity, niches and interactions with the human host[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(9): 585-599.
- [99] LANDRY BP, TABOR JJ. Engineering diagnostic and therapeutic gut bacteria[J]. *Microbiology spectrum*, 2017, 5(5).
- [100] VIGOUROUX A, BIKARD D. CRISPR tools to control gene expression in bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2020, 84(2): e00077-e00019.
- [101] CASSIR N, BENAMAR S, KHALIL JB, CROCE O, SAINT-FAUST M, JACQUOT A, MILLION M, AZZA S, ARMSTRONG N, HENRY M, JARDOT P, ROBERT C, GIRE C, LAGIER JC, CHABRIÈRE E, GHIGO E, MARCHANDIN H, SARTOR C, BOUTTE P, CAMBONIE G, et al. *Clostridium butyricum* strains and dysbiosis linked to necrotizing enterocolitis in preterm neonates[J]. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2015, 61(7): 1107-1115.
- [102] 刘敏, 吴金鸳, 陈从英. 不同粪菌悬液处理方式对猪粪菌移植过程中细菌活性及活菌组成的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(5): 1040-1048.
- LIU M, WU JY, CHEN CY. Effects of different treatments of faecal microbial suspensions on the activity and composition of live bacteria in faecal microbiota transplantation in pigs[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 51(5): 1040-1048 (in Chinese).
- [103] YANG H, WU JY, HUANG XC, ZHOU YY, ZHANG YF, LIU M, LIU Q, KE SL, HE MZ, FU H, FANG SM, XIONG XW, JIANG H, CHEN Z, WU ZZ, GONG HF, TONG XK, HUANG YZ, MA JW, GAO J, et al. ABO genotype alters the gut microbiota by regulating GalNAc levels in pigs[J]. *Nature*, 2022, 606(7913): 358-367.