

未培养微生物的研究与微生物分子生态学的发展*

叶姜瑜^{1,2} 罗固源^{1,2}

(重庆大学三峡库区生态环境教育部重点实验室 重庆 400045)¹

(重庆大学城市建设与环境工程学院 重庆 400045)²

摘要: 近年来现代分子技术和基因组学逐渐渗透到有关生命科学的整个领域, 也为微生物生态学提供了新的研究方法和机遇。16S rRNA 基因序列分析、DNA-DNA 杂交、核酸指纹图谱以及宏基因组学等分子技术检查自然环境中的微生物; 可以克服传统纯培养技术的不足, 是一条探知未培养微生物、寻找新基因及其产物的新途径, 开启了我们认识微生物多样性和获得新资源的大门。

关键词: 未培养微生物, 微生物分子生态学, 分子技术

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0111-05

Progress in the Biodiversity of Nonculturable Microorganisms and Microbial Molecular Ecology

YE Jiang-Yu^{1,2} LUO Gu-Yuan^{1,2}

(Chongqing University Key Laboratory of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education Chongqing 400045)¹

(City Construction and Environmental Engineering Academy, Chongqing University, Chongqing 400045)²

Abstract: Recent progress in molecular microbial ecology has revealed that traditional culturing methods fail to represent the scope of microbial diversity in nature, only a small proportion of viable microorganisms in a sample are recovered by culturing techniques. Molecular techniques, 16S rRNA sequencing, DNA-DNA hybridization, genetic fingerprinting technique and metagenomics etc, have become routine methods in microbial ecology, which are used to explore the diversity of uncultured microbial communities and obtain novel environmental DNA without any cultivation.

Key words: Nonculturable microorganism, Microbial molecular ecology, Molecular technique.

原核微生物是地球上最早的生命形式, 在数十亿年的进化过程中, 形成了适应各种环境的生理和分子机制, 占据了地球几乎所有环境, 包括没有其它生命形式能够共存的极端环境。微生物支撑着整个地球上的物质循环和生命的持续, 其多样性被用于监视和预测环境变化, 也是新基因资源的重要来源^[1]。但传统纯培养技术不能研究那些难以在实验室条件下生长的微生物, 不能反映自然界微生物多样性的丰度和范围, 使得微生物多样性资源这个巨大宝库也难以得到全面的开发和利用^[2]。

近年来基因组学和现代分子技术的成熟, 逐渐渗透到有关生命科学的整个领域, 也为微生物生态学提供了新的研究方法和机遇。16S rRNA 基因序列分析、DNA-DNA 杂交、核酸指纹图谱以及宏基因组学 (metagenomics)^[3] 等分子技术, 可以克服传统纯培养技术的不足, 提供了一种探知微生物多样性结构和功能基因组的方法, 是一条寻找新

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 50378095)
重庆大学骨干教师资助计划项目 (No. 716411045)
收稿日期: 2003-11-18, 修回日期: 2004-01-30

基因及其产物的新途径。

1 微生物的生物多样性

自然界中究竟有多少种微生物? 回答这个问题首先要明白它涉及到种的定义, 不同的定义会造成微生物数目的差异; 其次就是我们赖以认识微生物的方法, 纯培养技术和分子识别技术造成的数目认识差异是令人惊讶的^[4]。

经典的微生物分类是以形态学及其生化表征来进行的, 它不能够提供微生物的进化和自然发生关系。80年代, Woese 等根据 16SrRNA 相似性、DNA-rRNA 和 DNA-DNA 杂交的结果, 构建了生物之间的系统发育树, 勾勒出生物进化的大致轮廓。种 (species) 是定义生物多样性的最基本分类单元及分类等级, 在真核水平上有一个“生殖隔离”的通用概念作为区分物种的标准。但在原核生物系统发育中, 由于其缺乏严格意义的有性杂交, 过去半个世纪里主要是依靠培养、生化等表型特征来划分种, 也辅以基因型分类手段如 (G+C) mol%、DNA 杂交、rDNA 指纹图谱、质粒图谱和 16S rRNA 序列分析等。近年来微生物分类学家是以菌株 DNA 杂交同源程度来定义种的, DNA 杂交同源性 70% 以上或 16S rRNA 序列同源性 97% 以上定义为一个种。分子方法的使用意味着一个典型命名的种包含有许多生态型, 每一个都有种的通用特性, 这样命名出来的细菌种更象一个属而不是种。如果同样定义用到真核生物上的话, 将掩盖许多分类族的差异而被聚类为一个种, 如人类、猩猩和长臂猿就会被划为同一个种^[5]。

无论怎样划分, 原核微生物的丰富储量现在已经被大家逐渐认识到了。Whitman 等^[6] (1998) 认为海洋、土壤、海底泥及地表下微生物丰度分别为 1.2×10^{29} , 2.6×10^{29} , 3.5×10^{30} 和 $0.25 \sim 2.5 \times 10^{30}$ 。Amann 等 (1995) 以地球上昆虫数 (约 80 万种) 作参考进行了推测, 每只昆虫中都栖居有数百万至数 10 亿细菌, 其中 10% 的昆虫 (还有扁虱、螨类等) 有共同进化的专性共生体, 推测下来地球上应该有 30 万到 100 万原核生物存在。但令人遗憾的是, 仅有 5,000 种以下的原核生物被文献描述过, 流行的 Approved List of Bacterial Names 记载了 3,500 种, 权威的 Bergey 氏手册中记录了 3,100 种, 也就是意味着所知细菌可能仅占环境细菌多样性的 1% 或者更少。

2 纯培养技术-微生物多样性研究的限制性瓶颈

2.1 未培养微生物 (nonculturable microorganism) 微生物学长期以来是依靠纯培养技术研究微生物的, 然而, 纯培养方法也严重地限制了我们认识微生物的视野。许多未知细菌是以前从未培养过的, 缺乏再现环境条件的方法和培养基质, 造成了大多数微生物难以被标准实验室方法复苏和培养, 成为未培养微生物或称为不可培养微生物 (uncultured microorganism)^[1]。使用标准微生物学培养技术对不同生境微生物可培养性的测定来看, 海水中可培养性约为 0.001% ~ 0.100%, 淡水约 0.25%, 土壤约 0.3%, 活性污泥为 1% ~ 15% 左右。因此, 许多重要的微生物我们还不能识别, 包括引起疾病的病原菌, 或是调节全球矿物化过程所起重要作用的微生物。对复杂、多种类的微生物群落是最缺乏认识的领域, 特别是种群常以特殊方式排列的区域 (如生物膜), 微生物群落只有以特殊方式排列起来才有活性, 单独的微生物培养是不可能获得这样活性的^[7]。

2.2 VBNC (viable but nonculturable) -公认的未培养微生物 水微生物生态学家长期认识到, 某些时间某些细菌群体似乎从自然水体中消失, 仅在某些时期重现。这种可培

养性的降低被认为细胞进入一种活动但不能培养 (viable but nonculturable, VBNC) 状态^[8], 至少有 16 个属的 30 种细菌被报道有此现象发生, 它被认为是微生物暴露于胁迫环境的一种生存反应。徐怀恕等^[9]发现霍乱弧菌在其生活中, 处于低温、低盐、低营养物等不良生活条件下, 会变成活动但不可培养状态。

2.3 近自然条件的纯培养 自然培养和近自然纯培养长久以来都是微生物生态学家关注的重要课题之一。Kaeberlein T 等 (2002) 设计了一种称为扩散生长小室 (diffusion growth chamber) 的结构, 既允许营养物质和内外微生物产生的活性物质透过膜进出小室, 但细菌又不会逃逸。然后将许多这种小室放入沙池, 然后用海水覆盖。这样, 先前从未培养出的海滩菌株在小室中聚集并出现纯培养, 高于之前常规技术菌落数的 300 倍左右, 还分离到 2 种以前未知的微生物^[10]。从生态角度上看, 微生物生长是相互依存的, 在移植时不仅要分离有机体, 而是要连同它们所有的环境和邻居一起带走, 细菌就不会知道它们被移动了。另外, 细菌生长似乎不完全取决于食物供应, 很可能在增殖前会相互发出信号, 传送出特定种群所需听见的信息, 这已逐渐在由许多细菌形成的生物膜上被检测到。

3 分子生物学手段对未培养微生物的研究, 绕过“纯培养”技术

3.1 遗传指纹图谱技术对环境群落分析 80 年代的论文中, Torsvik 间接提到用 DNA 杂交动力学曲线, 可以评估土壤中的不可培养细菌。Woese 开创了分析 SSU rRNA 序列进行分类, Pace 及其同事^[4]首先认识到可以 16S rRNA 基因作为分子标记分析系统发育和生态系统。近十年来, 这些被广泛用于生物分类鉴定和基因分析比较的核酸指纹图谱技术, 已经迅速地应用于环境微生物学和生态学中。这些方法迅速、容易操作, 而且允许同时进行多样本分析, 这使得研究不同生境微生物群落的遗传多样性或者研究那些随着时间变化的个体群落行为成为可能 (表 1)^[11]。

表 1 微生物生态学中使用的遗传指纹图谱技术一览表

| 技术 | 优点 | 缺点 |
|-----------------|---------------|------------------------------------|
| LMW RNA | 直接; 不需要试管扩增步骤 | RNA 迅速降解; 有限的系统发育信息和 LMW RNA 的长度变化 |
| DGGE/TCGE | 群落中可能成员的鉴定、追踪 | 仅仅短片段 (ca. 550bp); 双链和异源双链核酸分子 |
| SSCP | 群落中可能成员的鉴定、追踪 | 仅仅短片段 (150-400nt); 重复性问题 |
| RAPD/DAF | 无特异引物设计要求 | 无法获得系统发育信息; 重复性问题 |
| Bb-PEG | 简单; 不需要贵重设备 | 低分辨率; 可用性及 Bb-PEG 染料的价格 |
| RFLP/ARDRA | 直接; 不需要贵重设备 | 带数同群落成员数无直接相关性 |
| T-RFLP/Flu-RFLP | 高分辨率; 片段直接定量 | 无法获得系统发育信息; 仪器昂贵 |

Höfle (1992) 使用 LMW RNA 法来检测淡水装置中的细菌种群动力学。Bidle 等 (1995) 使用 LMW RNA 法, 在一个海湾入口处比较自由生活与同微粒相连的细菌群落。Muyzer 及其同事 (1993) 首先将 DGGE 法应用到分子微生物生态学中, 用于剖析群落复杂性, 研究微生物群落中的种群动力学, 监控加富培养。Schwieger 等 (1998) 使用 SSCP 方法来分析不同植物根围的微生物群落。Breen 等 (1995) 使用 DNA 扩增指纹图谱 (DNA amplification fingerprinting, DAF), 比较不同生物反应器微生物群落, 监控生物反应器内的不同种群变化。Liu *et al.* (1997) 使用 T-RFLP 来确定微生物群落的遗传多样

性,它们检测了活性和生物反应器的污泥、蓄水沙层和白蚁肠道等。Vainio 等人从多个菌落中抽提出的 16S rDNA 进行测序,来检测活性淤泥中微生物种群结构,准确判定菌落中的微生物种群^[11]。

分子指纹图谱法高度敏感,可以在种群水平上提供可信的基因型信息;然而,对复杂微生物群落进行 DNA 分析,得到的信息将会过大,不利于分析。另外,遗传指纹图谱技术的偏差主要来自于快速生长的细菌,代谢指纹图谱技术不可能代替原位代谢分析。

3.2 宏基因组文库的构建和应用 GenBank 已经积累了众多可培养微生物的基因序列及资源。随着对环境微生物基因组研究需求的扩大,从研究环境中收集不可培育微生物全基因组序列的想法就自然产生了,Handelsman 和他的同事(1998)为这种全基因组创造了一个新名词“宏基因组”^[13,11],它包含了比可培养微生物大得多的遗传信息。美国 Western Oregon 大学于 1996 年起专门将其开设成为一门新课程。

宏基因组学的基本方法是分析微生物在环境中的基因组集合,直接分离未培养土壤微生物基因组 DNA,克隆到可培养微生物中,最后筛选所需的结果克隆。Rondon 首先构建了两个 BAC 文库,构建出大片段和大通量土壤细菌宏基因组文库,含有 12,000 个重组子形成土壤宏基因组文库 (metagenomic libraries),包含了超过 1 Gbp 的 DNA 序列,并由其克隆表达出一系列生理活性物质,表明宏基因组文库的遗传信息是一种可用资源^[3]。他们发现了两种新抗生素,命名为 turbomycin A 和 turbomycin B,同时他们还开发了一种 BAC 质粒高表达的方法,便于宏基因组 DNA 插入的高通量筛选^[12]。Gupta 等(2002)以 pUC18 从一个较小的土壤宏基因组文库中筛选碱性蛋白酶,在脱脂牛奶平板上分析其宏基因组 DNA 插入,筛选到一个 EDTA 敏感的、30 kD、275 个氨基酸残基和 pI 为 8.98 的金属蛋白酶;获得的宏基因组 DNA 资源只有 40% 左右在已知公共基因库中能查找到^[13]。

虽然宏基因组途径也需要分析化学来分离和鉴定感兴趣物质,但合成这些物质的基因已经携带在 BAC 质粒或其它质粒上,丢失的可能性极小,可以通过插入突变进行选择性地剔除,而获得的功能基因就能通过基因工程途径强化表达获得所需活性产物^[14]。不过,宏基因组的实际应用还受到许多技术和方法的限制,如宏基因组的代表性、文库的建设和适宜地存储与筛选手段等等,另外异源表达的相关问题也是限制其成功与否的关键。

4 微生物分子生态学的兴起及未来 10 年展望

微生物生态学的发展已经进入了一个新纪元,基因组学同生态学、系统分类学、分子进化和微生物化学的整合正在形成。依靠分子生物学技术,现在几乎可以在任何环境直接调查群落结构、多样性、微生物系统发育,对微生物个体类型或完整微生物群落进行定位。如进一步使用特异性 rRNA 探针进行荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH),甚至可在复合微生物群落中定点探测个体细胞及其交互作用。这些都表明微生物生态学和基因组学已经形成了一个交集,微生物分子生态学逐渐成型^[15]。

2002 年,美国微生物学会 (ASM) 一份名为“微生物生态学与基因组学:机遇的十字路口”^[4]的会议报告,对微生物生态学在未来 10 年的发展进行了规划和展望:(1) 发展新的微生物分类学理论框架,形成有基因组、蛋白组和代谢数据广泛支撑的系统

分类学；(2)以环境或医学相关种为基础，分析共生和非共生种类基因组序列（每类10~15种），用以评估种的概念，进一步理解物种形成的进程；(3)广泛进行一系列环境和时空规模的微生物遗传和生物多样性测定，解读地球上微生物多样性模式和生态、进化机制；(4)在未来10年内应建立一个同微生物和大型有机体基因组学、表型及其环境数据相关联的完整数据库；(5)发展研究微生物群落和共生的技术，能进行种群和单细胞水平的活性测定（表2）。

表2 微生物生态学未来10年发展进程规划

| 时间 (a) | 水平的复杂性 | 需要基因组学回答的问题 | 主要的技术和智力限制因子 |
|--------|--|---|---|
| 3 | 种 | 基因组的其它知识 评估种的概念 对系统分类学有用的大多数核心基因的鉴定 | 生物信息工具的改善 使用基因组数据形成种和高级分类学群组的概念 |
| 5 | 宏大种群 群落 I (极简单) 群落 II (简单) | 物种形成、进化的机制、最简基因组 | 比较基因组学 扣除杂交 |
| 10 | 群落 III (复杂) 微生物垫 (microbial mats) 肠道 口腔 海洋浮游生物 简单陆地生境 | 同生物地球化学活性有关的基因组 可持续性系统的最小基因集成 | 有效筛选基因的方法、群落中基因组集合 调节无件和网络控制 信号的阐明 生态活性的非扩散方法 监测单细胞活性 |

引自 David A S et al., 2002.

参 考 文 献

- [1] Newman D K, Banfield J F. *Science*, 2002, **296**: 1071 ~ 1077.
- [2] Pace N R. *Science*, 1997, **276**: 734 ~ 740.
- [3] Rondon M R, August P R, Betterman A D, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **66** (2): 541 ~ 547.
- [4] David A S, James T. ASM Colloquium "The global genome question: microbes as the key to understanding evolution and ecology", 2002, 10, (<http://www.asmsa.org/acasrc/aac1.htm>).
- [5] Cohan F M. *Annu Rev Microbiol*, 2002, **56**: 457 ~ 487.
- [6] Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. *Proc Nat Acad Sci*, 1998, **95**: 6578 ~ 6583.
- [7] Lawrence J R, Korber D R, Wolfaard G M, et al. *Adv Microb Ecol*, 1995, **14**: 1 ~ 75.
- [8] Bloomfield S F, Stewart G S A B, Doodl C E R, et al. *Microbiology*, 1998, **144**: 1 ~ 3.
- [9] 徐怀恕, 黄 备, 祁自忠, 等. *青岛海洋大学学报*, 1997, **27** (2): 187 ~ 190.
- [10] Kaebelein T, Lewis K, Epstein S S. *Science*, 2002, **296**: 1127 ~ 1129.
- [11] 叶姜瑜, 罗固源. *重庆大学学报*, 2003, **26** (3): 145 ~ 153.
- [11] Brady S F, Chao C J, Handelsman J, et al. *Org lett*, 2001, **3**: 1981 ~ 1984.
- [12] Gillespie D E, Brady S F, Betterman A D, et al. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 4301 ~ 4306.
- [13] Gupta R, Beg Q K, Lorenz P. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **59**: 15 ~ 32.
- [14] Rondon M R, Raffel S J, Goodman R M, et al. *Proc Nat Acad Sci*, 1999, **96**: 6451 ~ 6455.
- [15] David M, Purificaci3n L G. *Trends in Microbiology*, 2002, **10**: 31 ~ 38.