

肠道中有益菌培养组学的研究进展

玉霞, 赵飞燕, 孙志宏*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 农业农村部奶制品加工重点实验室,
内蒙古乳品生物技术与工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 肠道微生物在维持人体健康中起着重要作用, 特别是肠道中的有益菌。目前肠道微生物的研究手段仍以宏基因组等非培养技术为主, 利用宏基因组测序技术可发现肠道微生物与机体健康之间的关系。研究者发现肠道中大多数细菌是未被培养的, 其发挥作用的分子机制尚不明确, 而培养组学可通过改良培养基中成分, 优化培养条件, 使得肠道中一些难培养的微生物被成功分离培养。培养组学在肠道微生物中的应用为研究宿主与肠道微生物的相关功能和进一步筛选肠道中的有益菌提供了技术支持。因此, 利用培养组学技术培养出更多的肠道有益菌, 并对其进一步进行细菌表型和基因功能研究是今后的研究重点。本文对肠道微生物培养组学及肠道有益菌的培养方法进行综述, 为其应用于对人体健康有益的肠道微生物的培养提供参考。

关键词: 培养组学; 肠道微生物; 培养方法; 乳酸菌; 双歧杆菌

Progress in Culturomics Research on Beneficial Intestinal Bacteria

YU Xia, ZHAO Feiyan, SUN Zhihong*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: Gut microbes especially the beneficial ones play an important role in maintaining human health. At present, the research methods for intestinal microbes are mainly based on non-culture technologies such as metagenomics. The relationship between intestinal microbes and the body's health can be found by using metagenomic sequencing technology. Researchers have found that most of the bacteria in the gut are uncultured, and their molecular mechanisms of action are unclear. Culturomics can be used to successfully isolate and culture some intestinal bacteria difficult to culture by improving the composition of culture medium and optimizing the culture conditions. The application of culturomics provides technical support for research on the functions of intestinal bacteria in the host and further screening of beneficial intestinal bacteria. Therefore, using culturomics technology to cultivate more beneficial intestinal bacteria and studying their phenotypes and gene functions are future research priorities. This article reviews the culturomics of and the cultivation methods for intestinal beneficial bacteria for the purpose of providing a reference for the cultivation of beneficial intestinal microorganisms for human health.

Keywords: culturomics; gut microbes; culture methods; lactic acid bacteria; *Bifidobacterium*

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221210-103

中图分类号: Q93-335

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 23-0365-07

引文格式:

玉霞, 赵飞燕, 孙志宏. 肠道中有益菌培养组学的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(23): 365-371. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221210-103. <http://www.spkx.net.cn>

YU Xia, ZHAO Feiyan, SUN Zhihong. Progress in culturomics research on beneficial intestinal bacteria[J]. Food Science, 2023, 44(23): 365-371. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221210-103. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-12-10

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金重大项目 (2020ZD12)

第一作者简介: 玉霞 (1997—) (ORCID: 0000-0003-0212-2928), 女, 硕士研究生, 研究方向为乳酸菌资源利用与开发。

E-mail: haoyuxia616@163.com

*通信作者简介: 孙志宏 (1978—) (ORCID: 0000-0002-7605-2048), 男, 研究员, 博士, 研究方向为乳酸菌资源开发与利用。

E-mail: sunzhihong78@163.com

肠道微生物种类繁多且数量庞大,构成了独特且多变的生态系统。肠道中与宿主形成共生关系的微生物数量高达几十到几百万亿,是人体细胞数的10倍左右。肠道微生物被称为是“人类第二基因组”,对维持人类健康起着重要作用^[1]。肠道微生物大致可分为三大类:第一类为肠道有益菌,如乳杆菌属、双歧杆菌属和梭菌属等,其中乳杆菌和双歧杆菌是常见的有益菌,具有合成维生素、改善胃肠道环境、抑制肠道有害菌生长的功能,同时能代谢产生对人体有益的物质^[2];第二类为中性菌,如肠杆菌和肠球菌等,肠道微生态平衡时中性菌是无害的;第三类是有害菌,即肠道病原体,肠道中有害菌的数量增多,就会对免疫系统的功能产生不良影响,甚至会产生致癌物质,导致宿主发病^[3]。肠道中的微生物按一定比例组合,相互制约、相互依存,维持着肠道微生态的稳定性,一旦失衡,会引发一系列炎症反应及免疫系统疾病,因此肠道微生物对人体的健康至关重要。

近年来多组学技术的广泛应用促进了人们对肠道微生态的认识。宏基因组学技术的使用揭示了肠道微生物的多样性,发现肠道微生物在维持人体健康和疾病发生中起着重要的作用,宏基因组测序发现肠道中有大多数细菌仍未被培养^[4]。而培养组学可将此前从未在人体肠道中分离的菌种成功培养,只有经培养得到细菌,才能确定细菌对宿主的影响,而肠道中的部分有益菌因培养条件过于苛刻很难被大规模培养,因此在肠道微生物研究中培养组学的相关研究越来越重要。培养组学是利用多种培养条件与细菌的快速鉴定相结合的组学方法,在描述人类肠道微生物区系中发挥了重要作用。培养组学可以提供用于体外实验的细菌菌株,同时可以证实特定菌株在疾病发病机制中的作用,也可用于分离潜在的有益菌^[5]。宏基因组学技术揭示了肠道中有益菌与人类健康的关系,而进一步确定特定细菌在肠道中发挥作用的机制需要培养组学来获得细菌并进行研究,因此本文对肠道微生物中有益菌的培养组学相关研究进行综述,为肠道中的乳酸菌、双歧杆菌、嗜黏蛋白阿克曼菌(*Akkermansia muciniphila*, AKK菌)等有益菌的培养提供思路。

1 肠道微生物的功能

肠道为微生物提供了良好的栖息环境,而肠道微生物为机体提供营养,调节代谢,影响人体免疫系统,微生物之间相互制约、相互依存,共同维持肠道平衡。肠道中的有益菌可以通过不同的途径代谢产生短链脂肪酸,如丁酸、丙酸和乙酸等,这些物质对宿主的生理状态有着重要的影响^[6]。此外,肠道有益菌如双歧杆菌、乳酸菌等可以合成如VB、VK等各种营养素和一些非必需

氨基酸等物质保证宿主正常的生长发育^[7]。肠道有益菌还可以通过对营养物质和生态位的竞争抑制有害菌在肠道内的繁殖。研究指出肠道有益菌如乳酸杆菌可以通过产生乳酸、过氧化氢、细菌素等抑制肠道病原菌生长;有益菌定植于肠道黏膜后可以形成微生物屏障来阻止病原菌对肠道的黏附和入侵,进而保护机体免受感染。肠道微生物的紊乱与多种常见疾病的发生发展存在关系,例如肥胖、2型糖尿病、非酒精性肝病和心脏代谢疾病等^[8-9]。Gu Yanyun等^[10]通过药物与有益菌联合使用调节患者肠道微生物,从而改变血浆和胆汁酸的组成来改善代谢。Demirci等^[11]研究发现过敏性哮喘疾病患者肠道菌群中的AKK菌和普氏栖粪杆菌能诱导抗炎细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-10的分泌,并阻止IL-12等促炎细胞因子的分泌,抑制炎症。Liu Ailing等^[12]研究发现有益菌能调节肠道菌群提高宿主免疫进而改善哮喘患者的临床症状。肠道微生物在维持人体健康中发挥着重要的作用,其作用机制大多是通过宏基因组学去分析发现的,而微生物的纯培养技术近几年被忽视了,因此,利用培养组学技术培养肠道中有益菌可以为其与人类疾病的关系研究提供基础。

2 肠道微生物研究方法进展及培养组学概述

2.1 肠道微生物的研究方法进展

在传统的微生物学研究中,培养技术一直占据重要的地位,但由于技术和条件限制,绝大多数的细菌无法被成功培养,且越来越多的多组学研究结果显示肠道菌群对机体健康具有重要作用,因此研究者们也利用多种方法解析肠道菌群与宿主间的关系(表1)。在肠道微生物的研究方法中,变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)最初用来检测DNA片段中的突变,后被应用于微生物群落结构的相关研究^[13],16S rRNA基因测序和宏基因组测序是研究肠道微生物多样性的主要手段。16S rRNA基因测序可以对肠道微生物中的所有细菌进行测序,已被广泛用于表征细菌群落,其能对样品中的优势物种及一些未知物种进行检测研究,获得样品中的微生物群落组成及相对丰度,在微生物多样性研究中有重要意义^[14]。Guo Mengmeng等^[15]利用16S rRNA基因测序揭示了妊娠和哺乳期肠道微生物群和代谢物组成的变化,为有益菌维持健康的潜在用途提供了依据。宏基因组学被广泛应用于鉴定与生理状态或疾病相关的微生物,可以预测重要编码基因或通路的富集^[16],宏基因组测序已应用于研究各种疾病中肠道微生物组的功能变化,在此过程中发现仍有绝大多数细菌是未被挖掘培养的^[4]。培养组学技术在探索微生物多样性及可培养性的过程中仍面临着巨大挑战,未培养的细菌数量庞

大、种类繁多，体外培养条件可能不允许样品中所有细菌生长，可能的原因是培养基中不能包含满足所有细菌生长需要的营养物质，或在培养基中其他细菌产生了对目标生物体有抑制作用的物质，因此目前研究者们逐步开始使用培养组学的手段对未培养的细菌进行研究。

表1 肠道微生物研究方法的比较

Table 1 Comparison of research methods for gut microbiome

研究方法	名称	特点	缺点	参考文献
非培养组学	DGGE	操作简便快速，能识别复杂生态系统群落的分子指纹	对过大或者过小的片段分离效果不好	[13]
	16S rRNA 基因测序	低成本，高通量，灵敏度高，样品限制少	功能预测准确度相对较低，存在系统误差	[14]
	宏基因组测序	深入全面地分析微生物的物种、基因组成，同时无需分离纯化培养微生物	宿主干扰程度高，灵敏度比较低，低丰度基因难以检测	[15]
	实时定量聚合酶链式反应	能确定样品中菌体数量，操作简便、快速高效、特异性强	目的基因发生突变导致漏检，低浓度模板检测结果无法确定	[17]
培养组学	培养组学	培养并能鉴定某些未知细菌	培养条件过于苛刻，很难进行大规模培养	[18]

2.2 肠道有益菌的培养组学及其应用

培养组学是使用多种培养条件结合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法和16S rRNA测序技术来分离鉴定细菌种类的方法，被称为高通量的细菌分离培养方法。通常肠道微生物中培养组学是通过设计添加微量元素、生长促进因子及信号分子等来优化培养基，尽可能地模仿细菌所处的自然环境，从样品中获得一些不同种类的微生物及难培养的细菌^[18]。培养组学是在培养和鉴定定植在人体肠道中未知细菌的过程中发展起来的，被认为是宏基因组学的有效补充，是了解微生物生理、形态和功能的基本方法。基于宏基因组学的分析结果，依据对菌株代谢特性的预测，找到抑制或者适合菌株生长的添加物，获得难培养的微生物，这是培养组学研究的发展趋势。研究发现，培养组学可以用来挖掘肠道中新的微生物，Zou Yuanqiang等^[19]从健康人体的粪便中分离出6 000多种细菌，并提出由1 520个高质量的基因组草图组成的集合，基因组草图数量越多，则能更快速地将获得的基因序列与数据库进行比对，其数量依赖于微生物的培养情况。Amrane等^[20]通过对艰难梭状芽孢杆菌感染患者和健康人群的粪便进行培养后得到3株能抑制艰难梭状芽孢杆菌感染的细菌菌株，为治疗艰难梭状芽孢杆菌感染细菌提供了新的备选菌株。研究者们也通过培养组学分离肠道中潜在的有益菌。Alou等^[21]用培养组学和宏基因组学相结合的方法，从健康儿童肠道中鉴定出12种细菌，发现它们或许可以作为有益菌的备选菌株，促进胃肠道健康，使被破坏的肠道微生物多样性得以恢复。刘月姣等^[22]利用培养组学技术成功分离培养肺部微生物群，共获得101种已鉴定细菌、6株潜在新菌、2株真菌，为重点菌株的功能研究提供了菌株条件。培养组学

的发展为研究宿主-细菌关系提供了新的认知，为人体肠道微生物与疾病相关的研究提供新的思路。此外，研究发现在人类肠道微生物生态系统中，通常存在复杂的物种依赖性，不能使用简单、直接的培养方法来重现，因此在实验室培养肠道微生物的生态系统逐渐被人们挖掘研究，例如生物反应器、细胞培养插入系统、芯片器官模型和类器官等，其中生物反应器可以通过环境条件或用作微生物碳源或附着基质的宿主相关因素来模拟宿主输入，其不仅可以模拟人类肠道衍生的生态系统，还能模拟动物肠道衍生的微生物群落，同时该系统适合模拟胃肠道的流动环境，对维持和表征肠道微生物群落的高度多样性也很有效^[18]。而芯片器官模型能够模拟肠道蠕动，同时控制流体的连续流动、氧浓度和压力，这对维持厌氧肠道微生物群落物种的生存能力很重要^[23]。

培养组学不仅被应用于人类肠道微生物相关研究，而且在医学、工业、动物、植物、海洋和太空等领域都有研究。培养组学为在实验室生长不良的重要微生物提供了培养潜力，也可用于确认特定类型样品中是否存在活的微生物，该技术有助于在临床环境中识别快速生长但低浓度的微生物的存在^[20]。在动物微生物相关研究中，培养组学在识别肠道微生物组与各种牲畜健康的关系方面非常有用，通过培养组学可以确定用于动物健康的新型有益菌菌株，还有可能鉴定到样品中的新基因，从而更全面地了解动物肠道微生物组^[24-25]。在工业上，大型筛选程序用于寻找具有生物技术应用特性的微生物，培养组学则是通过基因组数据获得有关生长需求的信息，针对性地分离样品中的菌株，定制其培养条件范围。

3 肠道中有益菌的培养组学研究

3.1 乳酸菌的培养组学研究

乳酸菌是一类通过发酵碳水化合物从而产生大量乳酸的革兰氏阳性细菌的总称^[26]。乳酸菌可以调节机体胃肠道菌群以改善肠道微生态平衡，缓解乳糖不耐症，降低血清胆固醇含量及提高机体免疫力^[26]。由于人们越来越重视乳酸菌的功能特性及其对人体健康的有益作用，乳酸菌在医药、食品、生物技术等领域得到了广泛的应用。乳酸菌包括干酪乳杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌和乳酸乳球菌乳酸亚种等。乳酸菌对生长条件要求苛刻，偏好利用葡萄糖作为碳源为其生长提供能量，能加快细胞合成及新陈代谢，同时能代谢己糖^[27]，对单糖和双糖的代谢亲和力具有相似性，可将单糖和双糖发酵转化为乳酸。乳酸菌在氮源适宜的环境中能高效生长增殖，研究表明，促进乳酸菌生长效果最显著的氮源类物质为酵母膏，在培养基中添

加大豆蛋白和乳清蛋白水解物可促进乳酸菌的生长,多肽和寡肽可作为植物乳杆菌的有效氮源^[28]。乳酸菌生长过程中,无机盐作为缓冲物质添加到培养基中既能调节培养基pH值,也能增强菌株在应激条件下的自我保护能力^[29]。潘海博等^[30]确定了罗伊氏乳杆菌培养基中的低聚果糖、胰蛋白胍和L-半胱氨酸的添加量。Ricciardi等^[31]在乳清渗透物培养基中添加酵母提取物、蛋白酶、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和吐温80,并在37℃条件下厌氧培养干酪乳杆菌,发现其生长较好。Oyeniran等^[32]利用改良的强化梭菌培养基选择性分离培养出德氏乳杆菌保加利亚亚种。果蔬汁含多种营养元素,Wang Kun等^[33]发现将番茄汁作为外源因子加入乳酸菌的培养基中可促进菌株的增殖。Hayek等^[34]研究发现吐温所含的油酸可以影响细胞膜的组成,保护细胞免受酸性或营养消耗等不利环境的影响。在乳酸菌的培养基中可加入乳糖和葡萄糖作为碳源,添加酵母膏、大豆蛋白、乳清蛋白和多肽类等作为氮源,无机盐的添加可调节培养基的pH值,增强菌株自我保护能力,同时也可在培养基中添加果蔬汁等营养物来促进乳酸菌菌株的增殖,其大多数乳酸菌需在37℃下严格厌氧培养,培养时间16~72h不等。目前乳酸菌的有益作用不断被发现,因此筛选出营养丰富的培养基并确定更合适的培养条件来分离培养乳酸菌尤为重要。

3.2 双歧杆菌的培养组学研究

双歧杆菌是一种革兰氏阳性、不运动、细胞呈杆状、一端有时呈分叉状,多数为严格厌氧的细菌,是定植于人体肠道内的有益菌。双歧杆菌能调节肠道菌群,维持肠道菌群平衡,抑制致病菌生长繁殖,主要包括动物双歧杆菌、短双歧杆菌和长双歧杆菌等。双歧杆菌通常都很难培养,它们的培养通常与培养基中各种生长因子的存在有关,最适生长温度为37~41℃、最适生长pH值为6.5~7.0,其生长条件苛刻,营养物质要尽可能丰富,可添加小分子肽和低聚糖等益生元促进双歧杆菌的生长,还可以添加L-半胱氨酸盐酸盐、VC和丙酮酸钠等还原剂制造厌氧环境^[35]。Yang Shuanghong等^[36]研究发现双歧杆菌含有木聚糖等的核心糖苷水解酶类,木聚糖是一种有益于宿主健康的益生元,因此木聚糖可以作为选择性培养基的碳源来筛选和分离双歧杆菌,氮源主要是胰蛋白胍、蛋白胍、酵母提取物等。Lugli等^[37]利用宏基因组数据分析出菌株的碳源代谢,通过添加相应的碳源如木聚糖和支链淀粉等成功分离出新型双歧杆菌。Bondue等^[38]研究发现双歧杆菌如长双歧杆菌婴儿亚种在具有抗菌活性的母乳复合寡糖3'-唾液酸乳糖作为碳源的培养基中生长最佳。Dang等^[35]研究发现动物双歧杆菌在含有酵母提取物、大豆蛋白胍、葡萄糖、L-半胱氨酸和硫酸亚铁的培养基中生长良好。Centanni等^[39]发现短双歧杆菌利用乳糖能更好地生长。

双歧杆菌对氧气和温度环境敏感,耐氧性及稳定性低,筛选出具有良好性能菌株的培养基及培养条件有重要意义。在双歧杆菌的培养基中可添加乳糖、蔗糖和葡萄糖等作为碳源,蛋白胍及酵母提取物等作为氮源,同时可添加小分子肽、低聚糖、L-半胱氨酸盐酸盐、VC和丙酮酸钠等物质来促进双歧杆菌的生长,双歧杆菌需在37℃下严格厌氧培养24~48h。

3.3 下一代有益菌的培养组学研究

随着肠道微生物和人类疾病相关研究的不断深入,AKK菌、普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)和脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)等下一代有益菌正逐渐受到研究者的关注。AKK菌是于2004年从人类粪便中分离出来的革兰氏阴性细菌,越来越多的动物实验和临床试验证明AKK菌在预防或治疗糖尿病、心血管疾病、神经退行性疾病等方面有重要研究意义,可成为下一代有临床应用前景的有益菌^[40]。研究发现AKK菌膜上有一种耐高温的细菌蛋白,可抑制肥胖,还可以促进肠屏障功能^[41]。AKK菌是严格厌氧的细菌,在肠道黏液层中生长,利用宿主分泌的黏蛋白“为食”,因此其唯一的碳氮来源是黏液中的黏蛋白。黏蛋白是由肠上皮细胞分泌的一种高分子糖基化蛋白质,黏性大,大量分布在动物胃肠道表面^[42]。AKK菌在严格厌氧条件下且含有黏蛋白的培养基中生长状况最好,在培养温度20~40℃、pH 5.5~8.0之间时能更好地生长,其中最佳温度为37℃,最佳pH值为6.5,需严格厌氧生长。Oliphant等^[43]在模拟远端肠道环境的生物反应器中补充黏蛋白后发现可以富集大量的AKK菌,因此通过生物反应器培养AKK菌是可行的。冯熙瑞等^[44]研究发现阿拉伯半乳糖作为补充碳源对AKK菌有明显的促生长作用。Li Zhitao等^[45]研究发现AKK菌在具有体外先进仿生肠反应器的不同营养培养基中,使用人黏蛋白进行动态培养后生物量增加到了最高水平。在AKK菌的培养基中将黏蛋白作为碳氮来源,在严格厌氧条件下培养基的pH值为6.5、培养温度为37℃时培养48h为宜。

普拉梭菌是人类肠道菌群中最重要的细菌之一,其占健康人粪便样本中检测到的细菌总数的5%~15%。普拉梭菌是人结肠中重要的丁酸盐产生菌^[46],丁酸盐可为结肠上皮细胞提供能量,维持肠道屏障功能,抵抗氧化应激,同时能促进食物的消化及营养代谢,产生能被人体所利用的单糖或短链脂肪酸。普拉梭菌对氧极为敏感,但在培养基中加入核黄素、半胱氨酸或谷胱甘肽可使其在微氧环境下生长。Hu Wenbing等^[47]使用阴性筛选和特异性聚合酶链式反应扩增的组合从人类粪便中分离出26种新普拉梭菌菌株,进一步分析发现分离生长的最佳pH值在6.0~7.0之间,大多受到胆汁盐的抑制,普拉梭菌菌株可以利用麦芽糖、纤维素和果糖,但不能利用

木糖、山梨糖等。普拉梭菌培养基中可添加果糖作为碳源,添加核黄素、半胱氨酸或谷胱甘肽等小分子物质使其在微氧环境下更好地生长,培养基pH值在6~7之间、37℃条件下培养48 h为宜。

脆弱拟杆菌是一种厌氧菌,能分解糖并对胆汁耐受,寄居于人体肠道、口腔、呼吸道中。菌体成分多聚糖能维持消化系统平衡并提高机体抵抗力,从而帮助免疫系统保持平衡。研究发现利用添加了酵母提取物、半胱胺盐酸盐、胆盐、VK、血红素、葡萄糖、豆青素、庆大霉素、卡那霉素和新生霉素的脆弱拟杆菌培养基提高了临床标本中脆弱拟杆菌的回收率,该培养基也有利于对耐药菌株的监测^[48]。Livingston等^[49]用一种新的拟杆菌胆汁——七叶苜蓿脂培养基鉴定脆弱拟杆菌组。脆弱拟杆菌的培养基以木糖作为碳源,同时可添加酵母提取物、半胱胺盐酸盐和VK等促进菌株的增长,其培养条件是在37℃下严格厌氧48 h。随着功能菌株的不断研究,下一代有益菌在疾病中发挥作用的机制研究也越来越多,同时疾病与菌株间关系的研究也逐渐增多,而研究其关系的基础是培养出更多新的菌株。因此培养组学在研究肠道微生物时是必不可少的。肠道有益菌的代谢特点及培养条件相关内容如表2所示。

表2 肠道有益菌代谢特点及培养条件

Table 2 Metabolic characteristics and culture conditions of intestinal beneficial bacteria

菌名	代谢特点	培养条件的调整		参考文献	
		培养基优化	培养条件		
乳酸菌	干酪乳杆菌	代谢乳糖和半乳糖,产生有机酸	乳糖作为碳源	37℃厌氧培养16 h	[31]
	德氏乳杆菌保加利亚亚种	代谢果糖和乳糖	乳糖作为碳源,并添加L-半胱氨酸盐酸盐	44℃厌氧培养72 h	[32]
	瑞士乳杆菌	代谢果糖、麦芽糖和乳糖	乳糖作为碳源	37℃厌氧培养16 h	[50]
	植物乳杆菌	代谢乳糖和半乳糖	乳糖作为碳源	37℃厌氧培养48 h	[51]
	乳酸乳球菌乳酸亚种	代谢木糖、阿拉伯糖、纤维素二糖和半纤维素	木糖作为碳源	37℃厌氧培养48 h	[52]
双歧杆菌	动物双歧杆菌	代谢葡萄糖和乳糖	葡萄糖作为碳源,并添加L-半胱氨酸盐酸盐和硫酸亚铁	37℃厌氧培养24 h	[35]
	短双歧杆菌	代谢乳糖	乳糖作为碳源	37℃厌氧培养48 h	[38]
	长双歧杆菌	代谢蔗糖和果糖	蔗糖作为碳源,并添加L-半胱氨酸盐酸盐	37℃厌氧培养24 h	[53]
下一代有益菌	AKK菌	代谢葡萄糖	黏蛋白作为碳源	37℃厌氧培养48 h	[42]
	普拉梭菌	代谢果糖	苹果果胶作为能量来源	37℃厌氧培养48 h	[54]
	脆弱拟杆菌	代谢葡萄糖	木糖作为碳源	37℃厌氧培养48 h	[55]

4 结语

近几年,很多疾病和肠道菌群间的相关研究表明,肠道微生物与其宿主之间的关系错综复杂,越来越多的研究者加入了肠道微生物的相关研究中,肠道微生物构成会不断变化,在宿主健康状况良好的情况下,有益菌占比最大,有益菌对宿主发挥着重要的生理功能,通过

免疫系统和代谢等方面影响着宿主的健康,利用培养组学的技术分离培养出许多之前没被培养的有益微生物。研究发现肠道有益菌在人类疾病相关的预防和治疗中发挥着重要作用,因此对肠道有益微生物进行培养并解析具有重要意义。未培养的微生物有着丰富的基因、系统发育学信息以及生态学信息,更是待开发利用的庞大的生物资源。目前肠道中有些有益微生物很难进行大规模培养,继续探索肠道有益微生物及未培养细菌的培养方法尤为重要。培养组学是人体微生物多组学研究的基础,在人体肠道未知微生物的探索过程中,培养组学为疾病与肠道微生物的关系以及进一步筛选肠道中新型有益菌提供了技术支持。培养组学还可以在模拟自然环境的同时保证微生物之间的相关性,有效培养获得共生或协作的微生物,也可以获得优秀菌株,进而可以深入地探究菌株间的互作以及对健康的影响,这是今后可培养性研究的发展趋势。只有建立细菌的可培养机制才能更有目的地对不同类型的微生物进行大量开发利用,构建更完善的微生物多样性进化库,因此肠道有益微生物的培养技术是未来肠道微生物研究的发展方向之一。

参考文献:

- [1] HONG S T. Development of the cell microarray for high-throughput analysis of gut microbiota[EB/OL]. [2022-12-10]. DOI:10.1097/01.hjh.0000501487.78989.7a.
- [2] SENDER R, FUCHS S, MILO R, et al. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans[J]. Cell, 2016, 164(3): 337-340. DOI:10.1016/j.cell.2016.01.013.
- [3] SAMANTA S. Potential impacts of prebiotics and probiotics on cancer prevention[J]. Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2022, 22(4): 605-628. DOI:10.2174/1871520621999201210220442.
- [4] LAGIER J C, DUBOURG G, MILLION M, et al. Culturing the human microbiota and culturomics[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16: 540-550. DOI:10.1038/s41579-018-0041-0.
- [5] SORNPLANG P, PIYADEATSOONTORN S. Probiotic isolates from unconventional sources: a review[J]. Journal of Animal Science and Technology, 2016, 58: 26. DOI:10.1186/s40781-016-0108-2.
- [6] FU T, PAN L, SHANG Q, et al. Fermentation of alginate and its derivatives by different enterotypes of human gut microbiota: towards personalized nutrition using enterotype-specific dietary fibers[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 1649-1659. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.135.
- [7] RAMÍREZ-PÉREZ O, CRUZ-RAMÓN V, CHINCHILLA-LÓPEZ P, et al. The role of the gut microbiota in bile acid metabolism[J]. Annals of Hepatology, 2017, 16(Suppl 1): s21-s26. DOI:10.5604/01.3001.0010.5672.
- [8] FAN Y, PEDERSEN O. Gut microbiota in human metabolic health and disease[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(1): 55-71. DOI:10.1038/s41579-020-0433-9.
- [9] CUNNINGHAM A L, STEPHENS J W, HARRIS D A, et al. Gut microbiota influence in type 2 diabetes mellitus (T2DM)[J]. Gut Pathogens, 2021, 13(1): 50. DOI:10.1186/s13099-021-00446-0.

- [10] GU Yanyun, WANG Xiaokai, LI Junhua, et al. Analyses of gut microbiota and plasma bile acids enable stratification of patients for antidiabetic treatment[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1785. DOI:10.1038/s41467-017-01682-2.
- [11] DEMIRCI M, TOKMAN H B, UYSAL H K, et al. Reduced *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* levels in the gut microbiota of children with allergic asthma[J]. *Allergologia et Immunopathologia*, 2019, 47(4): 365-371. DOI:10.1016/j.aller.2018.12.009.
- [12] LIU Ailing, MA Teng, XU Ning, et al. Adjunctive probiotics alleviates asthmatic symptoms via modulating the gut microbiome and serum metabolome[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(2): e0085921. DOI:10.1128/Spectrum.00859-21.
- [13] GREEN S J, LEIGH M B, NEUFELD J D. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis[M]// TIMMIS K N. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Berlin: Springer, 2010: 4137-4158. DOI: 10.1007/978-3-540-77587-4_323.
- [14] JOHNSON J S, SPAKOWICZ D J, HONG B Y, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 5029. DOI:10.1038/s41467-019-13036-1.
- [15] GUO Mengmeng, CAO Xi, ZHANG Ke, et al. 16S rRNA gene sequencing revealed changes in gut microbiota composition during pregnancy and lactation in mice model[J]. *Veterinary Sciences*, 2022, 9(4): 169. DOI:10.3390/vetsci9040169.
- [16] QIN J J, LI R Q, RAES J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. *Nature*, 2010, 464: 59-65. DOI:10.1038/nature08821.
- [17] KÄRKKÄINEN P M, VALKONEN M, HYVÄRINEN A, et al. Determination of bacterial load in house dust using qPCR, chemical markers and culture[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2010, 12(3): 759-768. DOI:10.1039/b917937b.
- [18] RENWICK S, GANOBIS C M, ELDER R A, et al. Culturing human gut microbiomes in the laboratory[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2021, 75: 49-69. DOI:10.1146/annurev-micro-031021-084116.
- [19] ZOU Yuanqiang, XUE Wenbin, LUO Guangwen, et al. 1,520 reference genomes from cultivated human gut bacteria enable functional microbiome analyses[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(2): 179-185. DOI:10.1038/s41587-018-0008-8.
- [20] AMRANE S, HOCQUART M, AFOUDA P, et al. Metagenomic and culturomic analysis of gut microbiota dysbiosis during *Clostridium difficile* infection[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 12807. DOI:10.1038/s41598-019-49189-8.
- [21] ALOU M T, MILLION M, TRAORE S I, et al. Gut bacteria missing in severe acute malnutrition, can we identify potential probiotics by culturomics[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 899. DOI:10.3389/fmicb.2017.00899.
- [22] 刘月姣, 李俭杰, 孙一凡, 等. 利用培养组学技术分离培养肺部微生物群研究[J]. *微生物学报*, 2022, 62(3): 1110-1118. DOI:10.13343/j.cnki.wxsb.202110407.
- [23] JALILI-FIROOZINEZHAD S, GAZZANIGA F S, CALAMARI E L, et al. A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2019, 3(7): 520-531. DOI:10.1038/s41551-019-0397-0.
- [24] WANG X, HOWE S, WEI X, et al. Comprehensive cultivation of the swine gut microbiome reveals high bacterial diversity and guides bacterial isolation in pigs[J]. *mSystems*, 2021, 6(4): e0047721. DOI:10.1128/mSystems.00477-21.
- [25] 黄培鑫, 王世界, 夏超, 等. 荷兰斯坦奶牛瘤胃微生物分离鉴定及多样性分析[J]. *现代畜牧兽医*, 2020(3): 13-18.
- [26] GEORGE F, DANIEL C, THOMAS M, et al. Occurrence and dynamism of Lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2899. DOI:10.3389/fmicb.2018.02899.
- [27] TRONTEL A, ANA B, IVANA G, et al. Production of *D*- and *L*-lactic acid by mono- and mixed cultures of *Lactobacillus* sp.[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2011, 46: 75.
- [28] WU J Y, YAN X, WENG P F, et al. Homology- and cross-resistance of *Lactobacillus plantarum* to acid and osmotic stress and the influence of induction conditions on its proliferation by RNA-Seq[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(6): 576-590. DOI:10.1002/jobm.202100051.
- [29] CORREA DEZA M A, GRILLO-PUERTAS M, SALVA S, et al. Inorganic salts and intracellular polyphosphate inclusions play a role in the thermotolerance of the immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(6): e0179242. DOI:10.1371/journal.pone.0179242.
- [30] 潘海博, 覃璐琪, 梅丽华, 等. 罗伊氏乳杆菌LTR1318的培养工艺优化[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(10): 59-67; 314. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0350.
- [31] RICCIARDI A, ZOTTA T, IANNIELLO R G, et al. Effect of respiratory growth on the metabolite production and stress robustness of *Lactobacillus casei* N87 cultivated in cheese whey permeate medium[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 851. DOI:10.3389/fmicb.2019.00851.
- [32] OYENIRAN A, IBRAHIM S A, GYAWALI R, et al. A modified reinforced clostridial medium for the isolation and enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in a mixed culture[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(6): 5030-5042. DOI:10.3168/jds.2019-17894.
- [33] WANG Kun, MA Chengjie, GONG Guangyu, et al. Fermentation parameters, antioxidant capacities, and volatile flavor compounds of tomato juice-skim milk mixtures fermented by *Lactobacillus plantarum* ST-III[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2019, 28(4): 1147-1154. DOI:10.1007/s10068-018-00548-7.
- [34] HAYEK S A, GYAWALI R, ALJALOU S O, et al. Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products[J]. *The Journal of Dairy Research*, 2019, 86(4): 490-502. DOI:10.1017/S002202991900075X.
- [35] DANG T D, YONG C C, RHEEM S, et al. Optimizing the composition of the medium for the viable cells of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* JNU306 using response surface methodology[J]. *Journal of Animal Science and Technology*, 2021, 63(3): 603-613. DOI:10.5187/jast.2021.e43.
- [36] YANG Shuanghong, XIE Xinqiang, MA Jun, et al. Selective isolation of *Bifidobacterium* from human faeces using pangenomics, metagenomics, and enzymology[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 649698. DOI:10.3389/fmicb.2021.649698.
- [37] LUGLI G A, MILANI C, DURANTI S, et al. Isolation of novel gut bifidobacteria using a combination of metagenomic and cultivation approaches[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 96. DOI:10.1186/s13059-019-1711-6.
- [38] BONDUE P, CRÈVECOEUR S, BROSE F, et al. Cell-Free spent media obtained from *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium crudilactis* grown in media supplemented with 3'-sialyllactose modulate virulence gene expression in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1460. DOI:10.3389/fmicb.2016.01460.

- [39] CENTANNI M, FERGUSON S A, SIMS I M, et al. *Bifidobacterium bifidum* ATCC 15696 and *Bifidobacterium breve* 24b metabolic interaction based on 2'-*O*-fucosyl-lactose studied in steady-state cultures in a freter-style chemostat[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(7): e02783-18. DOI:10.1128/AEM.02783-18.
- [40] HASANI A, EBRAHIMZADEH S, HEMMATI F, et al. The role of *Akkermansia muciniphila* in obesity, diabetes and atherosclerosis[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2021, 70(10): 001435. DOI:10.1099/jmm.0.001435.
- [41] DEPOMMIER C, EVERARD A, DRUART C, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(7): 1096-1103. DOI:10.1038/s41591-019-0495-2.
- [42] LIU X Y, ZHAO F, LIU H, et al. Transcriptomics and metabolomics reveal the adaption of *Akkermansia muciniphila* to high mucin by regulating energy homeostasis[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 9073. DOI:10.1038/s41598-021-88397-z.
- [43] OLIPHANT K, PARREIRA V R, COCHRANE K, et al. Drivers of human gut microbial community assembly: coadaptation, determinism and stochasticity[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(12): 3080-3092. DOI:10.1038/s41396-019-0498-5.
- [44] 冯熙瑞, 马岩石, 武晓玲, 等. 非靶向代谢组学分析阿拉伯半乳糖对嗜黏蛋白阿克曼菌代谢物的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(7): 21-34. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2021100007.
- [45] LI Zhitao, HU Guoao, ZHU Li, et al. Study of growth, metabolism, and morphology of *Akkermansia muciniphila* with an *in vitro* advanced bionic intestinal reactor[J]. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1): 61. DOI:10.1186/s12866-021-02111-7.
- [46] WALKER A W, DUNCAN S H, LOUIS P, et al. Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota[J]. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(5): 267-274. DOI:10.1016/j.tim.2014.03.001.
- [47] HU Wenbing, GAO Wenyu, LIU Zongmin, et al. Biodiversity and physiological characteristics of novel *Faecalibacterium prausnitzii* strains isolated from human feces[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 297. DOI:10.3390/microorganisms10020297.
- [48] HO P L, HO L Y, YAU C Y, et al. A novel selective medium for isolation of *Bacteroides fragilis* from clinical specimens[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017, 55(2): 384-390. DOI:10.1128/JCM.01988-16.
- [49] LIVINGSTON S J, KOMINOS S D, YEE R B. New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1978, 7(5): 448-453. DOI:10.1128/jcm.7.5.448-453.1978.
- [50] ZANG J, WANG T, PIOTR D, et al. Increasing lactose concentration is a strategy to improve the proliferation of *Lactobacillus helveticus* in milk[J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(2): 1050-1060. DOI:10.1002/fsn3.2076.
- [51] PARK S, KIM D, KANG H, et al. Enhanced production of γ -aminobutyric acid (GABA) using *Lactobacillus plantarum* EJ2014 with simple medium composition[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 137: 110443. DOI:10.1016/j.lwt.2020.110443.
- [52] GOLOMB B L, MARCO M L. *Lactococcus lactis* metabolism and gene expression during growth on plant tissues[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(2): 371-81. DOI:10.1128/JB.02193-14.
- [53] SCHÖPPING M, GASPAR P, NEVES A R, et al. Identifying the essential nutritional requirements of the probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium longum* through genome-scale modeling[J]. *NPJ Systems Biology and Applications*, 2021, 7(1): 47. DOI:10.1038/s41540-021-00207-4.
- [54] MIQUEL S, MARTÍN R, BRIDONNEAU C, et al. Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*[J]. *Gut Microbes*, 2014, 5(2): 146-151. DOI:10.4161/gmic.27651.
- [55] TAN H Z, ZHAO J X, ZHANG H, et al. Isolation of low-abundant bacteroidales in the human intestine and the analysis of their differential utilization based on plant-derived polysaccharides[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1319. DOI:10.3389/fmicb.2018.01319.