

微生物微培养系统研究现状与展望

陈政霖^{1,2}, 马春玄^{1,2}, 邢新会^{1,2,3}, 张翀^{1,2,3}

1 清华大学 化学工程系 生物化工研究所, 北京 100084

2 工业生物催化教育部重点实验室, 北京 100084

3 清华大学 合成与系统生物学中心, 北京 100084

陈政霖, 马春玄, 邢新会, 等. 微生物微培养系统研究现状与展望. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1151-1161.

Tan ZL, Ma CX, Xing XH, et al. Micro-cultivation system in microbiology: frontiers and prospects. Chin J Biotech, 2019, 35(7): 1151-1161.

摘要: 微生物培养是微生物学的起源和根本, 成功的微生物培养是进行后续研究的重要前提与基础。但是, 微生物培养操作不仅耗费了科研人员大量的精力和时间, 还存在着极大的人为误差。近年来, 容量小、高通量、模块化、可操作性良好并可进行在线检测的微生物微培养系统得到了微生物学领域的广泛关注。文中介绍了应用于微生物学领域的微培养系统, 并按系统构成分类讨论了微生物微培养系统的发展、应用和展望。

关键词: 微培养系统, 微生物培养, 自动化培养系统, 模块化培养系统, 微流控系统

Micro-cultivation system in microbiology: frontiers and prospects

Zhenglin Tan^{1,2}, Chunxuan Ma^{1,2}, Xinhui Xing^{1,2,3}, and Chong Zhang^{1,2,3}

1 Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

2 Key Laboratory for Industrial Biocatalysis of the Ministry of Education, Beijing 100084, China

3 Center for Synthetic and Systems Biology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: Microbial cells cultivation is not only the origin, but also the foundation of microbiology. Researches in microbiology can only be carried out when the microbial cells can be cultured. However, conventional microbial cell cultivation is not only time consuming and labour intensive, but human error is also inevitable. Recent years, automated, modularised microbial cells micro-cultivation systems with small volume, good controllability, and equipped with real-time monitoring system have attracted great attention in microbiology. This review presents the state-of-the-art micro-cultivation systems which are implemented in microbial cells cultivation. The key development, applications of various system classified

Received: March 13, 2019; **Accepted:** May 14, 2019

Supported by: National Key Scientific Instrument and Equipment Project of The National Natural Science Foundation of China (No. 21627812), National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFF0202303), Tsinghua University Initiative Scientific Research Program (No. 20161080108).

Corresponding author: Chong Zhang. Tel: +86-10-62772249; Fax: +86-10-62787472; E-mail: chongzhang@tsinghua.edu.cn

国家重大科学仪器设备开发专项 (No. 21627812), “十三五”国家重点研发计划 (No. 2016YFF0202303), 清华大学自主科研项目 (No. 20161080108) 资助。

based on their construction, and the prospects of micro-cultivation system are discussed and insights into them are also provided.

Keywords: micro-cultivation system, microbial cells cultivation, automated cultivation system, modularised cultivation system, microfluidic systems

微生物培养作为微生物学的根源,却是一个极少被关注的领域^[1]。法国化学家 Pasteur 被认为是最早可重复培养微生物的科学家,他使用以灰烬、糖和铵盐为配方的培养基,成功实现了微生物的稳定培养^[2]。Koch 在 Pasteur 所研发的培养基配方的基础上进行了改良,在培养基中加入了牛肉提取物或牛血清,使微生物能够更好地生长^[3]。上述液体培养技术的开发原本是为了培养纯培养物,但是,使用液体培养基进行连续稀释纯化微生物的难度较高且操作效率极低,这个问题促使 Koch 开发出了能够分离出单克隆的固体培养基^[4]。固体培养技术作为最初实现平行培养的技术,至今仍是微生物学,尤其是临床微生物学中的黄金标准。

虽然传统的批量培养系统因廉价、可操作性高等优点而被广泛使用,但是随着微生物的生长,培养基中的化学成分将会发生变化,从而导致系

统噪音的产生,影响结果判断。为此, Monod、Novick 和 Szilard 提出了能够减少系统噪音的连续培养系统用于追踪微生物的生长和进化(图 1)^[5-7]。通过连续换液,培养器中的养分得以维持稳定,进而保证了微生物的持续生长。同时,由于连续培养器中都带有控制器件,可实现操作的自动化。现有的微生物连续培养系统主要分为恒化器 (Chemostat) 和恒浊器 (Turbidostat) 两大类。前者采用开环控制器,后者采用闭环控制器进行系统控制,用以稳定微生物培养条件。

近年来,微生物反应器的微型化和平行化逐渐得到研究者的关注。微型生物反应器作为一种可长时间以少量试剂运行的系统,通过引入各种分析技术实现了多参数的精密检测和控制,同时通过操作自动化,减少了实验中人为操作失误和产生的误差。此外,借助多参数精密调控和平行

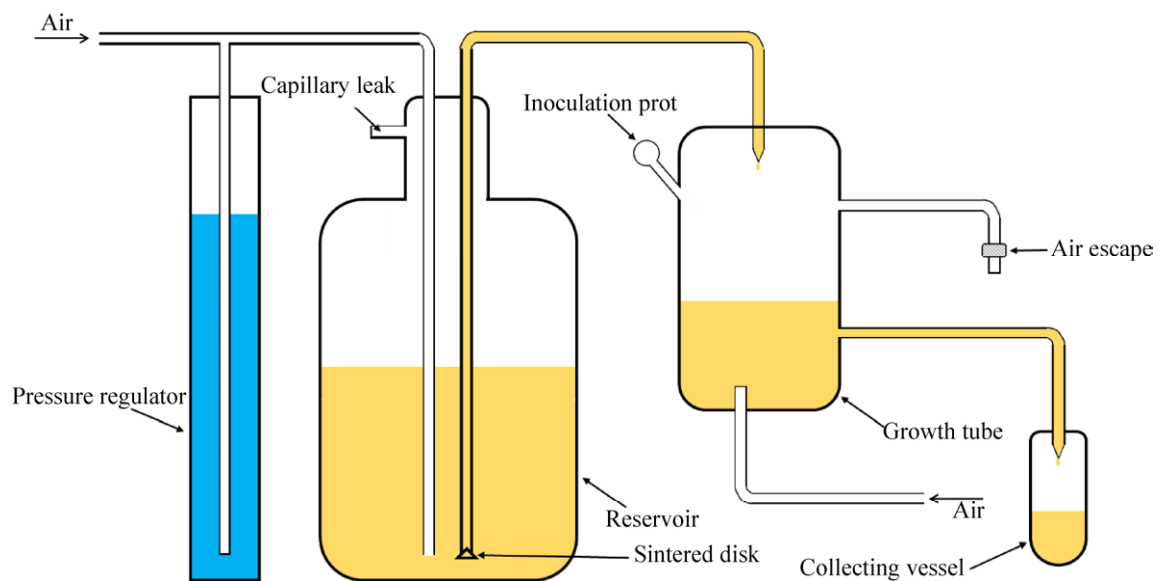


图 1 恒化器的设计图

Fig. 1 Schematic diagram of chemostat.

化操作能力, 可以同时进行多项实验, 大幅提高了实验效率。在特定条件下, 培养体系还能够实现单细胞培养, 用以研究微生物群中一些容易被忽视的个体。因此, 微生物微培养系统和技术逐渐成为实验室微生物培养的应用趋势。

1 微连续培养系统

微连续培养系统是一种可用于微生物自动连续培养的毫升级微生物培养系统。图 2 为微连续培养系统的概念图, 系统主要由光学器件、控制器件、无菌导管、磁力搅拌器以及一些附加元件如毫流控 (Millifluidics)、温控装置等组成。该系统将菌液置于无菌导管中, 培养至一定条件后, 可根据传感器所输出的调节信号, 按设备设计以及实验需求, 加入培养液或其他试剂。培养过程中, 通过不间断的磁力搅拌, 旧的培养液与新的培养液均匀混合, 并使得氧气能够更有效地溶入培养液中, 维持微生物的生长。当内部体积达到一定水平后, 培养液将因器皿内外的压力差而被排出, 实现连续培养系统的换液功能。这一系统所使用的器件多为容易入手或可借助 3D 打印技术等简单的加工方法制造的器件, 相较于其他大型设备, 该设备制造成本低, 占用空间小, 并且可使用一个控制器件同时监测多个管道, 实现高通量的微生物培养与分析。这些优势使恒浊器及其衍生仪器得以在实验室中普及。

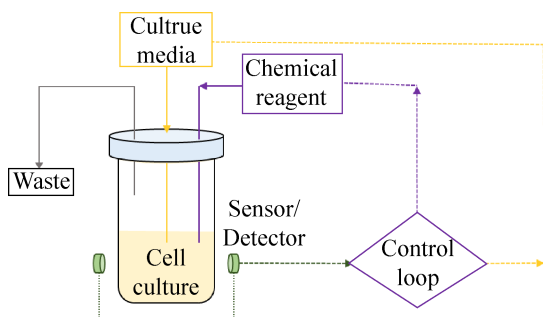


图 2 毫升级连续培养系统的设计图

Fig. 2 Schematic diagram of milliliter scale continuous cultivation system.

2011 年, Toprak 等改良了传统恒浊器的设计, 并使用微连续培养系统进行了微生物微容量培养^[8-9]。Toprak 等使用这套系统进行了微生物的抗药性研究, 并在过程中证明了该套装置可实现微生物的长期自动化培养^[8]。

Takahashi 等设计的微型恒浊器是第一台开源性微型恒浊器^[10-11]。借助 3D 打印技术和模块化零件的使用, 这套系统的制造成本低于 2000 美元。这套系统的另一个特点在于能够同时在线检测微生物的浓度和表达量。其通过切换导管上所安装的 650 nm 和 470 nm 激发光源以及选择适当的滤光片, 成功地实现了恒浊器浊度和荧光的在线检测。此后虽然也有其他的相关尝试^[12-13], 但是 3D 打印技术难以实现高精度加工, 导致这些开源性微型恒浊器的运行误差较大, 降低了实验的可重复性。该问题通过将硅胶管道换成聚四氟乙烯管道, 并通过加湿加压的方法得到了改善^[14]。2018 年, Wong 等发明了使用模块化零件组成的连续培养仪 eVOLVER^[15]。相较于其他的微连续培养器, 该仪器内置了温控装置, 可为每个培养器分别加热, 排除了将装置置于恒温培养箱中保温而导致的加热不均匀所造成的误差, 也可实现在温度调控上的多样性实验。此外, eVOLVER 中的流体操作皆通过毫流控管路调控, 从另一角度解决了由硅胶管所带来的进样精度问题。

2 微流控微培养系统

随着精密仪器和光电技术的发展, 科学家们于 20 世纪末发明了微全分析系统 (μ TAS)^[16-17]。这套系统使人们能够更好地于微观和介观尺度上操控流体, 进而实现微容量反应。这项技术促进了可操控单细胞的皮升级微生物微培养装置如芯片上培养皿^[18]、真菌生物薄膜动力学在线检测芯片^[19]、单细胞操控装置^[20]和皮升级培养槽^[21]的开发。这些皮升水平的装置尺寸一般小于毫米,

可用于操作微生物单细胞,并观测单细胞的生长,是微生物培养领域的划时代工作。通过不断地导入培养液和透过培养槽壁上的缝隙排出多余的微生物细胞^[22],皮升级培养槽能够实现恒浊器中的开环控制器功能,成功将恒浊器微化至皮升水平。图3为微流控微培养系统的概念图,其中,图3A为单相微流控微培养系统,图3B为液滴微流控微培养系统。

2.1 单相微流控中的微容量培养

虽然连续培养在微生物培养中拥有一定的优势,但是在营养过剩的培养体系中容易形成生物薄膜^[23]。在微培养器中,由于尺度效应,这个现象将会更加严重^[24]。生物薄膜的形成,不仅容易干扰连续培养器的运行^[25],还将在进行稀释后成为占据培养液空间的主要微生物,影响分析结果。2005年,Balagaddé等使用微流控技术,成功地在微尺度上制造恒化器,实现了长时间微生物培养,并通过阀的调控,实现了对黏附在通

道壁上的微生物薄膜的清除和菌液的稀释^[26-27](图3A)。该芯片可置于显微镜下进行单细胞水平的观察和分析,这一功能的实现意味着所取得的数据将从平均信号转向统计信号。这一进步让我们能够观测如标准偏差等除了平均数据以外的、传统的实验条件下所无法观测的信号。但是,这套微流控系统中使用了较为复杂的能动装置,如微蠕动泵。虽然这样的零件容易被嵌入微流控芯片中,提高流体的可操作性,但也同时提高了系统的复杂程度和损坏概率。该体系中培养的微生物密度可达每毫升 2×10^9 个大肠杆菌细胞,与摇瓶培养所得结果接近。

得益于尺寸效应,基于微流控技术的微培养器中具备传质性能方面的优势,例如Lee等所开发的容量为1 mL的微流控恒化器和恒浊器中的氧传递率可达到 $k_L a \approx 0.025 \text{ s}^{-1}$,混合2 s即可达到完全混合状态。此外,该系统能够将流体控制精度调整到18 nL,且对温度、细胞密度、溶

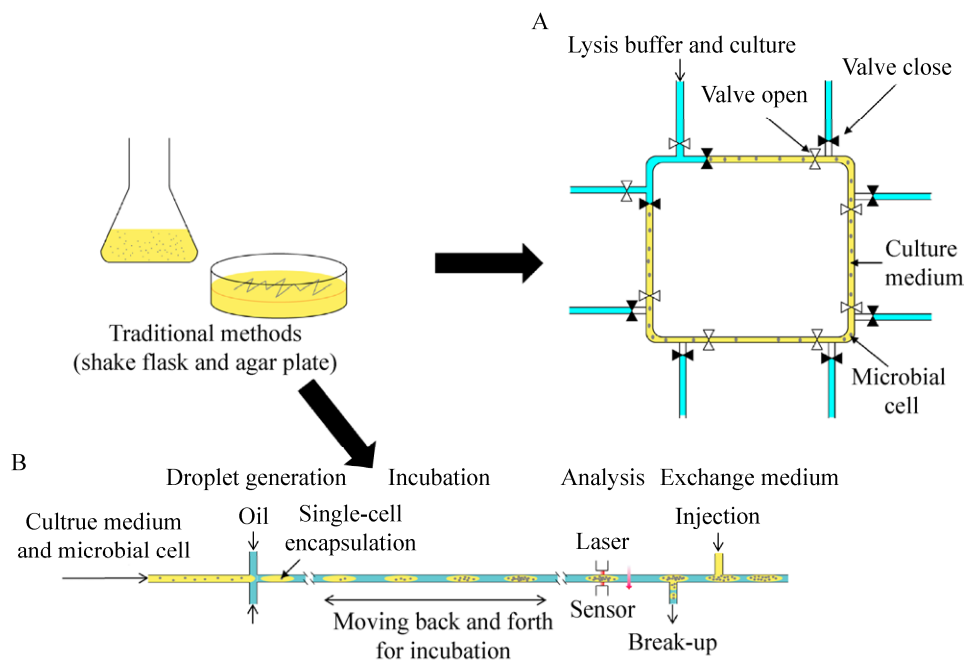


图3 微流控微培养系统

Fig. 3 Microfluidic-based micro-cultivation system. (A) Single-phase microfluidic micro-cultivation system. (B) Droplet-based microfluidic micro-cultivation system.

氧和 pH 都能够以闭环控制的方式达到精确调控;通过对阀和泵的调控,可在单个装置内同时实现批量培养、恒化器或者恒浊器的功能^[22]。但是,单相流体因运输液与反应液相同,容易出现污染现象^[28]。如 Lee 等的装置对无菌条件的维持只能达到 3 周^[22],难以实现一般微生物进化等实验中所要求的长达数月的连续培养。同时,单相流体意味着培养液中的养分为所有微生物共享而非独立,这仍然无法解决关于生长缓慢的微生物的培养问题。此外,单相微流控系统中流体流动所产生的剪切力对培养中的微生物也会造成影响。

2.2 微液滴培养

微生物微液滴培养技术的起源可追溯至 1950 年, Lwoff 使用液滴培养巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*, 并对其溶源性进行了相关研究。得益于液滴内微生物操作的简便性,即易于观察、运输和换液, Lwoff 成功实现了在显微镜下观察噬菌体对微生物所产生的影响,同时也证明了在不含噬菌体的液滴中的微生物的可培养性^[29-30]。相较于摇瓶等宏观体系,作为拥有大范围自由表面的流体,微液滴体系的大比表面积利于气体交换,提高了培养效率。同时,作为独立生物反应器的微液滴,也使生长缓慢的微生物的富集和高通量分析成为可能。此外,一般情况下,大分子难以穿透液滴界面,避免了样品污染和生物薄膜形成的问题。

Weaver 是近代首先在临床微生物学中使用液滴体系的科学家。Weaver 等将微生物按一定比例混入海藻酸钠溶液中,使用振动开口将液流切断形成液滴,滴入氯化钙溶液中固化成微球。其中,海藻酸钠溶液中加入了 pH 响应荧光显色剂。微生物代谢过程中所生成的二氧化碳可提高液滴内的酸性程度,使显色剂变色,在荧光显微镜下观察就能判断液滴内微生物的生长情况。液滴体系的优势使含微生物液滴足以在一个分裂周期内

就能够被观察到明显的变色,从而使这套系统成为了一套高效的微生物检测系统^[31-32]。由于该装置的液滴生成机制与流式细胞仪相近,液滴中的微生物包覆率也如同流式细胞仪,可使用泊松分布进行预测^[33]。根据泊松分布的定义^[34-36],影响微生物包覆率的关键参数为单位容量中微生物浓度和单位容量可生成的液滴数的比例。这意味着在能够得知液滴平均容量的情况下,只有微生物浓度会对包覆率造成较大的影响。换言之,在微生物分布均匀的前提条件下,其他因素如液滴大小等,并不会影响微生物的包覆率。

虽然批量乳化液滴生成效率高,但是却无法进行液滴后期操作,限制了液滴体系的应用。2001 年, Thorsen 等首次在微流道内生成了粒径均一的液滴^[37],从此翻开了液滴微流控技术的历史篇章。液滴微流控技术不只给批量乳化所带来的粒径分布较大的问题提供了解决方案,也促进了液滴后期操作技术的发展,如皮升注入^[38-39]、荧光激活液滴分选 (Fluorescence-activated droplet sorting)^[40]、结合^[41]、切割^[42]等技术,实现了液滴内多步反应,使液滴体系成为一种更为稳定的操作体系。

Grodrian 等提出了使用液滴微流控高通量培养微生物的方法,并证明了在特氟龙管道内 60 nL 培养液中的大肠杆菌 *Escherichia coli* 和荧光假单胞杆菌 *Pseudomonas fluorescens* 的可培养性,其培养密度可达到每个液滴 10^6 细胞^[43]。Dewan 等在芯片中生成包裹普通小球藻 *Chlorella vulgaris* 的液滴,并通过 33 d 的保存,观察了普通小球藻于液滴中的分裂与生长,以及各阶段的产脂肪酸效率,并推算出了普通小球藻的生长动力学^[44]。Ito 等开发了一种可连续换液的开放微液滴反应器,实现了微液滴恒化器的功能^[45]。如今,液滴微流控微培养系统能够实现在线单细胞包覆、培养、换液、分析等功能^[46-47],已是一项相对成熟

的技术 (图 3B)。

近年, 清华大学成功将微生物微液滴培养技术装备化, 开发了一套名为全自动高通量微生物液滴培养仪 (Microbial microdroplet culture (MMC) system) 的装置 (图 4)。该系统使用微流控芯片进行微生物培养液滴生成和换液, 液滴体积 $2 \mu\text{L}$, 可同时并行对 200 个独立的微生物液滴进行培养和连续传代。特别的, 由于在油包水微小体系内液滴内容氧和混合水平良好, 其中的微生物生长性能接近或优于摇瓶。此外, 基于芯片系统的模块化优势, MMC 系统还可满足多样的实验需求, 例如培养物荧光、可见光、溶氧和 pH 在线检测、微生物菌落计数、高通量筛选、适应性进化等不同功能, 显示出较大的应用潜力。

3 应用

如前节所描述, 微生物微型生物反应器在微生物学的研究上有着极其广泛的应用。本节旨在介绍微生物微型生物反应器在微生物学研究上的应用。

3.1 微生物耐药性和进化研究

微生物在获得了对某种药物的抗性之后, 选择压力将会被减轻^[22], 这时需要向培养基内添加化学因子, 以维持选择压力, 而这项需求使微生物抗药性研究成为一项极具挑战性的工作。Toprak 等开发的微型生物反应器 Morbidostat, 是一种能够维持选择压力的装置。在该培养器中, 系统在所设定的时间点上通过光学传感器对微生物进行浓度检测。当微生物的浓度达到预设浓度, 同时生长速度大于 0 时, 系统将通过调控向导管中加入含化学因子的培养液, 对微生物施加选择压力。此后, 在预设的时间内, 当导管中的微生物浓度同时满足上述两个条件时, 系统将会继续向导管内添加含化学因子的培养液, 维持微环境中的选择压力; 而在任意一个条件未被满足的情况下, 系统则只向培养器内添加培养液, 以复苏微生物。Toprak 等使用这套系统研究了大肠杆菌的去氧羟四环素、氯霉素和甲氧苄啶抗性的形成过程, 发现了甲氧苄啶抗性形成过程中的阶段性适应现象, 并揭示了微生物达到高抗药性的

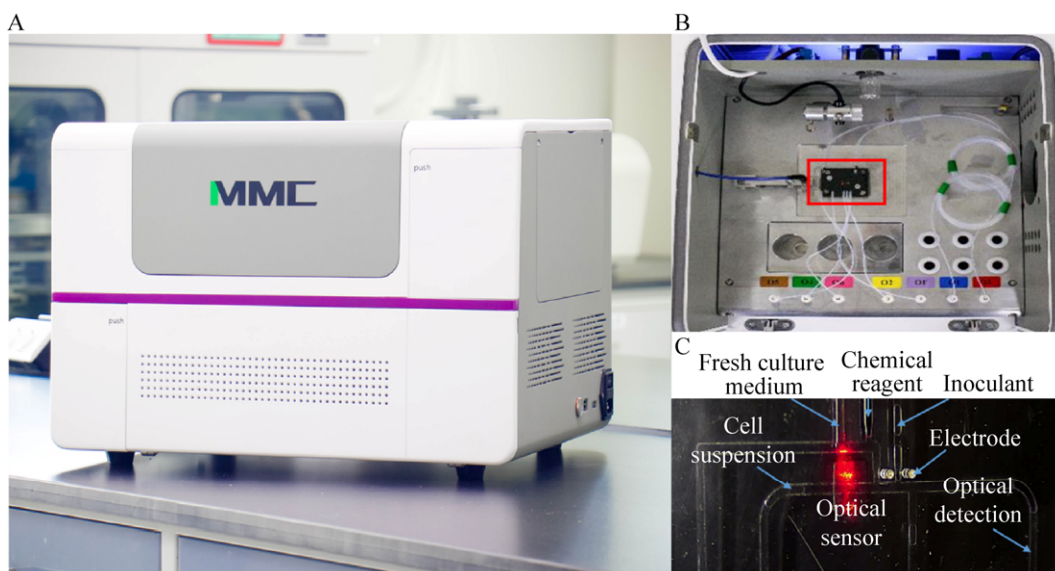


图 4 全自动高通量微生物液滴培养仪

Fig. 4 Microbial microdroplet culture (MMC) system. (A) The outer design of MMC. (B) The inner design of MMC. The millifluidic chip is indicated with red rectangle. (C) Millifluidic chip for droplet generation, droplet coalescence, droplet segregation and detection.

有序适应途径^[8]。Baraban 等则在液滴中分析了头孢噻肟对模式菌株大肠杆菌 MC4100-YFP 的最小抑菌浓度^[46]。他们所开发的设备操控精度高,可调配浓度变化为 $3.562 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ 的精细浓度梯度变化,为一般孔板的 133 倍以上,为微生物耐药性分析带来了一套高效的研究设备。

3.2 微生物高通量分析分选

在微生物微型生物反应器中,可通过取样至微孔板进行荧光检测或在线检测的方式实现高通量检测。虽然这种检测方式的通量较传统检测方式有所提高,但是一些微弱的信号容易被忽视,难以实现单细胞水平的分析。借助荧光激活细胞分选技术和荧光激活液滴分选技术,微生物微型生物反应系统能够实现微生物的高通量分选。

Agresti 等使用液滴微流控技术进行菌库分析,分选出了较母株所产辣根过氧化物酶活性高 10 倍的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*^[48]。Staffan 等使用荧光激活液滴分选技术,对产 α 淀粉酶的酿酒酵母进行分选,成功地从菌库中筛选出了高 α 淀粉酶产量的酿酒酵母^[49-50]。Benevise 等则成功地使用荧光激活液滴分选技术分选出了高 α 淀粉酶产量的黑曲霉 *Aspergillus niger*^[51]。他们也用这套技术培养并分选了产 β -1,4-内切木聚糖酶 B 和 C、1,4- β -纤维二糖水解酶 A、葡聚糖内切酶 A 和天冬氨酸蛋白酶的解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica*^[52]。Kim 等则使用液滴微流控分选出了高生长速度和高产油率的莱氏衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii*^[53]。

通过在液滴中共培养生物传感器和微生物细胞工厂, Siedler 等成功地使用微生物生物传感器感知胞外产物的产量,并将高产量菌株选出,突破了传统代谢工程的瓶颈^[54]。在 Siedler 的实验中,我们还可以设想将生产菌株在液滴中单独培养,而传感器在液滴或摇瓶中培养后,再通过皮升注射的方式注入含生产菌株的液滴内进行检

测,这套技术便可实现使用培养条件不同的菌株分别作为生产菌株和传感器了。

这些高通量分选技术也被进一步应用于未知微生物的生物资源勘探 (Bioprospecting),例如 Najah 等开发了 β -D-纤维二糖苷-6,8-二氟-7-羟基香豆素-4-甲磺酸盐^[55],并将其作为荧光底物,利用 Griffiths 课题组开发的荧光激活液滴分选芯片^[40],成功地从土壤样本中筛得产纤维素酶微生物^[56]。

随着吸光度激活液滴分选 (Absorbance-activated droplet sorting) 技术^[57]和拉曼激活液滴分选 (Raman-activated droplet sorting)^[58]等新技术的开发和普及,我们将能够识别更多自然界中所存在的未知分子和产出这些分子的菌株。

3.3 微生物富集

通过加入合适的化学因子,微连续培养系统可用于培养能够适应某种选择压力的微生物。在换液和添加化学因子的过程中,只有适应环境压力的微生物能够存活、生长和增殖,这些拥有特定特征的微生物因此能够被富集。例如,Toprak 等富集了对所使用的药物有抗性的微生物^[8]。

但是,微连续培养系统无法富集生长缓慢的微生物,这是由于在共同的生长环境中,生长较快的微生物将会在养分竞争中优越于生长缓慢的微生物,并完全取代这些微生物。而能够包覆并培养单细胞的微液滴技术则能够富集这些生长较为缓慢的微生物。Bachmann 等于 2013 年使用液滴富集成长缓慢但却拥有较高代谢效率的乳酸菌突变体的研究成果^[59]推动了液滴微生物学的进步,并使液滴微生物学受到了微生物学领域的广泛关注。

此外,在富集和探索未被培养的微生物的过程中,微液滴技术也有着重要的应用。Akselband 等使用搅拌乳化技术将已被荧光染色的海洋微生物包入凝胶液滴中,再使用流式细胞仪对液滴进行分选,选出包裹着海洋微生物的液滴,并在这些

含微生物的液滴中成功地培养和富集了生长缓慢的海洋微生物 APP462^[60]。

3.4 未知微生物的探索

世界上可培养的微生物只占据了微生物总数的 1%^[61-64]。绝大部分微生物的不可培养性限制了我们对于微生物表型的认知, 导致我们难以理解自然界中的许多现象, 并因此错失了许多自然界中的资源。这些微生物不能被培养的原因主要有两个: 第一, 这些微生物的特性未被解明, 所需要的养分未知; 第二, 实验室中所使用的培养基的养分比自然环境中多数倍至数百倍, 虽然能够使微生物快速生长, 但同时也抹杀了成长缓慢的微生物。Zobell 研发的海水肉汤 marine agar 2216^[65] 中所含的有机成分就比自然海水中多 170 倍。虽然使用生长环境的样本也能够培养这类微生物^[66-67], 但是如果这类微生物与其他微生物、生物或非生物之间存在共生关系, 那么这类微生物也无法生存。Kaeberlein 等开发了一种名为渗透捕抓器的工具 (图 5), 证明了难培养微生物与原环境间存在共生关系^[68]; D'Onofrio 等发现从彭德森湖滨州立公园中分离的一种黄海芽孢杆菌 *Bacillus marisflavi* 在缺少环境中存在的一种巨

大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 所分泌的成长因子时便无法生长^[69]。因此, 实现高通量共培养和在线检测将有利于未知微生物的探索。

最近十年, 研究人员逐渐意识到了未知微生物的重要性, 继而开发了各类难培养微生物的培养工具。渗透捕抓器被成功地用于富集多样的环境微生物样本^[68,70]。Nichols 等开发了一种微型化的渗透捕抓器, 名为分离芯片 (Isolation chip, ichip) 的高通量原位培养工具^[71]。该芯片有 384 (2 192) 个直径为 1 mm 的穿透微孔。将含微生物琼脂糖注入孔中后, 固化成固体培养基。芯片两面贴上 0.03 μm 滤膜, 另外以两片芯片将含固体培养基芯片夹起, 键合即形成分离芯片。将分离芯片置于原位环境或原位环境样本中, 可高通量培养难培养微生物。相较于渗透捕抓器, 微型化让渗透芯片实现了更高通量的未知微生物培养。但是, 该方法仍然依赖于原位环境培养法, 无法为难培养微生物的人工培养提出有效的解决方案。

虽然无法通过单细胞共同培养的方式优化培养条件以及从混合环境样本中锁定微生物, 但是微型连续培养系统可以通过长时间连续共培养和监测的方式, 在低养分培养基中人工培养至今未被成功培养的微生物。Park 等通过微液滴中微生物的共培养, 不仅证明了微液滴内能够实现相互依赖的微生物的共培养^[72], 还成功地培养了海鞘中的菌群, 并证明了使用海水胰蛋白胨大豆肉汤所培养的菌群虽然生长较为缓慢, 但是富有多样性^[73]。

4 结论与展望

自 Louis Pasteur 成功地在实验室中培养微生物以来, 至今已过了 160 年, 但是从实验室中可培养的微生物占比和科研人员在微生物培养中所耗费的时间可得知, 微生物培养技术进步甚微。其主要原因在于传统的批量和连续培养体系的容

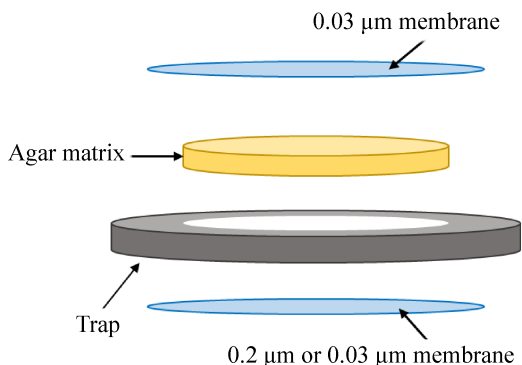


图 5 渗透捕抓器的组成部分

Fig. 5 Parts forming a diffusion trap. When microbial cell is not inoculated into the agar matrix, one of the membranes can be replaced with 0.2 μm membrane to enrich microbial cells from *in situ* environment.

量大,难以对培养环境进行精密调控,且培养成本高,难以实现平行化和高通量培养。微生物微培养体系则能为上述问题提供重要的解决方案。结合微生物培养技术发展史,以及目前工程技术发展趋势和微生物培养中的需求,我们认为未来微生物微培养系统的重要发展趋势将包括:

1) 全流程自动化。生物实验的低可重复性已经是一个不争的事实^[74]。微生物培养系统通过与物联网 (Internet of Things, IoT) 技术结合,将组成微生物实验操作仪器网络中的重要一环,实现无人干预的实验操作,降低由人为失误所带来的不可重复性。例如,将清华大学所开发的常压室温等离子体 (Atmospheric room temperature plasma, ARTP) 诱变育种仪^[75]和 MMC 等进行整合即可实现诱变、复苏、初步富集、单细胞连续培养、菌落操作、结果分析的智能调控全自动操作过程。

2) 数据化。在微生物学研究中,微生物的基因型-表型关联 (Genotype-phenotype association, GPA) 一直是一项重要的课题^[76]。凭借先进的测序技术虽然可以测得许多基因数据,但是直至今日,表型数据的获取仍然远远滞后于基因型数据。利用微培养系统的可追踪性和可监测性将会为基因型-表型关联研究提供有效工具。具体而言,高通量地追踪培养系统里的微生物,并对它们进行在线检测,将使我们能够获得大量与微生物培养性能相关的表型数据,从而为深入研究微生物表型与基因型的关联提供数据基础。

REFERENCES

- [1] Monod J. The growth of bacterial cultures. *Ann Rev Microbiol*, 1949, 3: 371–394.
- [2] Pasteur L. Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1857, 45: 913–916.
- [3] Koch R. Die aetiologie der tuberculose. *Berl Klin Woch*, 1882, 19: 221–230.
- [4] Sakula A. Baroness burdett-coutts' garden party: the international medical congress, London, 1881. *Med Hist*, 1982, 26(2): 183–190.
- [5] Monod J. La technique de culture continue. *Theorie et application*. *Ann Inst Pasteur*, 1950, 79(4): 390–410.
- [6] Novick A, Szilard L. Description of the chemostat. *Science*, 1950, 112(2920): 715–716.
- [7] Novick A, Szilard L. Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1950, 36(12): 708–719.
- [8] Toprak E, Veres A, Michel JB, et al. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat Genet*, 2012, 44(1): 101–105.
- [9] Toprak E, Veres A, Yildiz S, et al. Building a morbidostat: an automated continuous-culture device for studying bacterial drug resistance under dynamically sustained drug inhibition. *Nat Protoc*, 2013, 8(3): 555–567.
- [10] Takahashi CN, Miller AW, Eknesh F, et al. A low cost, customizable turbidostat for use in synthetic circuit characterization. *ACS Synth Biol*, 2015, 4(1): 32–38.
- [11] Klavins lab open-source mixture controlled turbidostat wiki: homePage[EB/OL]. [2018-10-01]. <https://depts.washington.edu/soslab/turbidostat/pmwiki/pmwiki.php?n=Main.HomePage>.
- [12] Matteau D, Baby V, Pelletier S, et al. A small-volume, low-cost, and versatile continuous culture device. *PLoS ONE*, 2015, 10(7): e0133384.
- [13] Callens C, Coelho NC, Miller AW, et al. A multiplex culture system for the long-term growth of fission yeast cells. *Yeast*, 2017, 34(8): 343–355.
- [14] Skelding D, Hart SFM, Vidyasagar T, et al. Developing a low-cost milliliter-scale chemostat array for precise control of cellular growth. *Quant Biol*, 2018, 6(2): 129–141.
- [15] Wong BG, Mancuso CP, Kiriakov S, et al. Precise, automated control of conditions for high-throughput growth of yeast and bacteria with eVOLVER. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(7): 614–623.
- [16] Terry SC, Jerman JH, Angell JB. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE Trans Electr Dev*, 1979, 26(12): 1880–1886.
- [17] Angell JB, Terry SC, Barth PW. Silicon micromechanical devices. *Sci Am*, 1983, 248(4): 44–55.
- [18] Inoue I, Wakamoto Y, Moriguchi H, et al. On-chip culture system for observation of isolated individual cells. *Lab Chip*, 2001, 1(1): 50–55.
- [19] Richter L, Stepper C, Mak A, et al. Development of a microfluidic biochip for online monitoring of fungal biofilm dynamics. *Lab Chip*, 2007, 7(12): 1723–1731.
- [20] Zhu Z, Frey O, Ottoz DS, et al. Microfluidic single-cell cultivation chip with controllable immobilization and selective release of yeast cells. *Lab Chip*, 2012, 12(5): 906–915.

- [21] Grünberger A, Paczia N, Probst C, et al. A disposable picolitre bioreactor for cultivation and investigation of industrially relevant bacteria on the single cell level. *Lab Chip*, 2012, 12(11): 2060–2068.
- [22] Lee KS, Boccazzi P, Sinskey AJ, et al. Microfluidic chemostat and turbidostat with flow rate, oxygen, and temperature control for dynamic continuous culture. *Lab Chip*, 2011, 11(10): 1730–1739.
- [23] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol*, 1995, 49: 711–745.
- [24] Larsen DH, Dimmick RL. Attachment and growth of bacteria on surfaces of continuous-culture vessels. *J Bacteriol*, 1964, 88: 1380–1387.
- [25] Topiwala HH, Hamer G. Effect of wall growth in steady-state continuous cultures. *Biotechnol Bioeng*, 1971, 13(6): 919–922.
- [26] Balagaddé F, Hansen CL, Kartalov E, et al. Microfluidic chemostat: US, 8426159B2. 2013-04-23.
- [27] Balagaddé FK, You LC, Hansen CL, et al. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science*, 2005, 309(5731): 137–140.
- [28] Zhang CS, Xing D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(13): 4223–4237.
- [29] Lwoff A. Lysogeny. *Bacteriol Rev*, 1953, 17(4): 269–337.
- [30] Lwoff A, Gutmann A. Recherches sur un *Bacillus megatherium* lysogène. *Ann Inst Pasteur*, 1950, 78(6): 711–739.
- [31] Weaver JC, Seissler PE, Threefoot SA, et al. Microbiological measurements by immobilization of cells within small-volume elements. *Ann N Y Acad Sci*, 1984, 434(1): 363–372.
- [32] Weaver JC, Williams GB, Klivanov A, et al. Gel microdroplets: rapid detection and enumeration of individual microorganisms by their metabolic activity. *Nat Biotechnol*, 1988, 6(9): 1084–1089.
- [33] Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 2003.
- [34] de Moivre A. De mensura sortis, seu, de probabilitate eventuum in ludis a casu fortuito pendentibus. *Philos Trans Roy Soc Lond*, 1710, 27(329): 213–264.
- [35] Poisson SD. *Recherches sur la Probabilité des Jugements en Matière Criminelle et en Matière Civile, précédées des Règles Générales du Calcul des Probabilités*. Paris: Bachelier, 1837.
- [36] Soper HE. Tables of Poisson's exponential binomial limit. *Biometrika*, 1914, 10(1): 25–35.
- [37] Thorsen T, Roberts RW, Arnold FH, et al. Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Phys Rev Lett*, 2001, 86(18): 4163–4166.
- [38] Abate AR, Hung T, Mary P, et al. High-throughput injection with microfluidics using picoinjectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(45): 19163–19166.
- [39] O'Donovan B, Eastburn DJ, Abate AR. Electrode-free picoinjection of microfluidic drops. *Lab Chip*, 2012, 12(20): 4029–4032.
- [40] Baret JC, Miller OJ, Taly V, et al. Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. *Lab Chip*, 2009, 9(13): 1850–1858.
- [41] Bremond N, Thiam AR, Bibette J. Decompressing emulsion droplets favors coalescence. *Phys Rev Lett*, 2008, 100(2): 024501.
- [42] Link DR, Anna SL, Weitz DA, et al. Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices. *Phys Rev Lett*, 2004, 92(5): 054503.
- [43] Grodrian A, Metze J, Henkel T, et al. Segmented flow generation by chip reactors for highly parallelized cell cultivation. *Biosens Bioelectron*, 2004, 19(11): 1421–1428.
- [44] Dewan A, Kim J, McLean RH, et al. Growth kinetics of microalgae in microfluidic static droplet arrays. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(12): 2987–2996.
- [45] Ito M, Sugiura H, Ayukawa S, et al. A bacterial continuous culture system based on a microfluidic droplet open reactor. *Anal Sci*, 2016, 32(1): 61–66.
- [46] Baraban L, Bertholle F, Salverda MLM, et al. Millifluidic droplet analyser for microbiology. *Lab Chip*, 2011, 11(23): 4057–4062.
- [47] Jakiela S, Kaminski TS, Cybulski O, et al. Bacterial growth and adaptation in microdroplet chemostats. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52(34): 8908–8911.
- [48] Agresti JJ, Antipov E, Abate AR, et al. Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(9): 4004–4009.
- [49] Huang MT, Bai YP, Sjoström SL, et al. Microfluidic screening and whole-genome sequencing identifies mutations associated with improved protein secretion by yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(34): E4689–E4696.
- [50] Sjoström SL, Bai YP, Huang MT, et al. High-throughput screening for industrial enzyme production hosts by droplet microfluidics. *Lab Chip*, 2014, 14(4): 806–813.

- [51] Beneyton T, Mahendra Wijaya IP, Postros P, et al. High-throughput screening of filamentous fungi using nanoliter-range droplet-based microfluidics. *Sci Rep*, 2016, 6: 27223.
- [52] Beneyton T, Thomas S, Griffiths AD, et al. Droplet-based microfluidic high-throughput screening of heterologous enzymes secreted by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 18.
- [53] Kim HS, Hsu SC, Han SI, et al. High-throughput droplet microfluidics screening platform for selecting fast-growing and high lipid-producing microalgae from a mutant library. *Plant Direct*, 2017, 1(3): e00011.
- [54] Siedler S, Khatri NK, Zsohár A, et al. Development of a bacterial biosensor for rapid screening of yeast *p*-coumaric acid production. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(10): 1860–1869.
- [55] Najah M, Mayot E, Mahendra-Wijaya IP, et al. New glycosidase substrates for droplet-based microfluidic screening. *Anal Chem*, 2013, 85(20): 9807–9814.
- [56] Najah M, Calbrix R, Mahendra-Wijaya IP, et al. Droplet-based microfluidics platform for ultra-high-throughput bioprospecting of cellulolytic microorganisms. *Chem Biol*, 2014, 21(12): 1722–1732.
- [57] Gielen F, Hours R, Emond S, et al. Ultrahigh-throughput-directed enzyme evolution by absorbance-activated droplet sorting (AADS). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(47): E7383–E7389.
- [58] Wang XX, Ren LH, Su YT, et al. Raman-activated droplet sorting (RADS) for label-free high-throughput screening of microalgal single-cells. *Anal Chem*, 2017, 89(22): 12569–12577.
- [59] Bachmann H, Fischlechner M, Rabbers I, et al. Availability of public goods shapes the evolution of competing metabolic strategies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(35): 14302–14307.
- [60] Akselband Y, Cabral C, Castor TP, et al. Enrichment of slow-growing marine microorganisms from mixed cultures using gel microdrop (GMD) growth assay and fluorescence-activated cell sorting. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2006, 329(2): 196–205.
- [61] Lok C. Mining the microbial dark matter. *Nature*, 2015, 522(7556): 270–273.
- [62] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12): 6578–6583.
- [63] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1995, 59(1): 143–169.
- [64] Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*, 1998, 180(18): 4765–4774.
- [65] Zobell CE. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J Mar Res*, 1941, 4: 42–75.
- [66] Button DK, Schut F, Quang P, et al. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3): 881–891.
- [67] Schut F, de Vries EJ, Gottschal JC, et al. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(7): 2150–2160.
- [68] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "Uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 2002, 296(5570): 1127–1129.
- [69] Stewart EJ. Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol*, 2012, 194(16): 4151–4160.
- [70] Bollmann A, Lewis K, Epstein SS. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(20): 6386–6390.
- [71] Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, et al. Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "Uncultivable" microbial species. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(8): 2445–2450.
- [72] Park J, Kerner A, Burns MA, et al. Microdroplet-enabled highly parallel co-cultivation of microbial communities. *PLoS ONE*, 2011, 6(2): e17019.
- [73] Park JH. Microdroplet-enabled co-cultivation and characterization of microbial communities[D]. Ann Arbor, Michigan: University of Michigan, 2012.
- [74] Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature*, 2016, 533(7604): 452–454.
- [75] Zhang X, Zhang XF, Li HP, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(12): 5387–5396.
- [76] Dutilh BE, Backus L, Edwards RA, et al. Explaining microbial phenotypes on a genomic scale: GWAS for microbes. *Brief Funct Genomics*, 2013, 12(4): 366–380.

(本文责编 陈宏宇)