

微生物暗物质分离培养——以 CPR 和 DPANN 类群为例

姜凯^{1,2*}, 曹春玲³

(1. 内蒙古师范大学 生命科学与技术学院, 内蒙古 呼和浩特 010022;

2. 内蒙古自治区高等学校生物多样性保护与可持续利用重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010022;

3. 内蒙古自治区农牧业技术推广中心, 内蒙古 呼和浩特 010010)

摘要 候选门级辐射类群(candidate phyla radiation, CPR)细菌和DPANN超门古菌是重要的微生物暗物质, 约占地球细菌和古菌多样性的一半。目前对于CPR和DPANN的研究处于起步阶段, 仅获得了少数的实验室培养菌株, 代表着丰富的菌种资源和基因资源的潜力; 同时其生态功能还未知, 预示着未来新发现的巨大机遇。本文在总结现有微生物分离培养方法以及CPR和DPANN菌株共性特征的基础上, 对已实现实验室培养的CPR和DPANN菌株进行归纳和分析, 提出该类群菌株分离培养的几点建议, 以期为今后对该类群菌株的分离培养提供参考。CPR细菌和DPANN古菌的可培养研究有助于加深对该类群菌的认识, 阐明其生活方式、进化及演变规律并揭示其独特的代谢途径及功能基因, 发现新的天然活性产物, 具有重要的科学意义及应用价值。

关键词 微生物暗物质; 候选门级辐射类群; DPANN; 细胞微小; 共生生活; 分离培养

中图分类号 Q93-335 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2023)02-0096-10

doi: 10.3969/j.issn.1005-7021.2023.02.011

Isolation and Cultivation of Microbial Dark Matter— Take CPR and DPANN Group as Examples

JIANG Kai^{1,2*}, CAO Chun-ling³

(1. *Coll. of Life Sci. & Tech., Inner Mongolia Normal Uni., Hohhot 010022*; 2. *Key Lab. of Biodiversity*

Conserv. & Sustain. Util. for Coll. & Uni. in Inner Mongolia Auton. Reg., Hohhot 010022;

3. *Agric. & Anim. Husb. Tech. Popular. Ctr. of Inner Mongolia Auto. Reg., Hohhot 010010*)

Abstract Candidate phyla radiation (CPR) bacteria and DPANN superphyla archaea are important microbial dark matter, accounting for approximately half of all the bacterial and archaeal diversity of the planet. At present, their researches are in the initial stage. Only a few cultured strains in laboratory of CPR and DPANN have been obtained so far. They represent rich resource of strains and genes, while their ecological functions are unknown, representing great opportunities for new discovery in the future. Based on introduction of the existing methods of microbial isolation and culture and common characteristics of CPR and DPANN, the CPR and DPANN strains that have been realized in cultivation in laboratory were summarized and analyzed, and some suggestions for the isolation and cultivation of the two groups were put forward, so as to provide reference for the future isolation and cultivation. The cultivation study on CPR and DPANN is helpful to deepen the understanding of the two groups, clarify their lifestyle and evolution rules, reveal their unique metabolic pathway and functional genes, and discover new natural active products, which has important scientific significance and application value.

Keywords microbial dark matter; candidate phyla radiation; DPANN; small cell size; symbiotic lifestyles; isolation

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(2020BS03006); 内蒙古师范大学引进高层次人才科研启动经费项目(2018YJRC015)

作者简介: 姜凯 男, 讲师, 博士。研究方向为环境微生物资源开发与利用。E-mail: jiangkai@imnu.edu.cn

* 通讯作者。

收稿日期: 2022-04-01

and cultivation

“微生物暗物质”(microbial dark matter)指未实现实验室培养的微生物^[1-2],其在碳、氮等元素循环中发挥着重要作用^[3-4],是新基因资源和新天然产物的巨大宝库^[5-8],同时影响着周围生物及环境。随着组学技术的发展,借助深度测序及生物信息分析手段,大量“微生物暗物质”基因组被获取、解读,极大扩充了生命之树上的分支^[9]。2004年,Tyson等^[10]从天然碱性生物膜中直接获取并重构出2株未培养细菌(*Leptospirillum* group II和*Ferroplasma* type II)的近乎全部基因组。随后,不断有未培养微生物的基因组被直接测序、组装。2016年,Anantharaman等^[11]利用宏基因组技术从地下水及沉积物中获得了2 500多个宏基因组组装的基因组(metagenome-assembled genomes, MAGs),其中包含了47个新门级的细菌类群。2017年,Parks等^[12]对1 500多个已公开的宏基因组数据进行分析并获得了将近8 000个MAGs,其中包含了17个新门水平的细菌、3个新门水平的古菌。2021年,Nayfach等^[13]统计了从不同生境获取的10 000多个宏基因组数据,共包括52 515个MAGs,其中12 556个MAGs代表了跨越135个门的候选新种。然而,这也进一步加剧了微生物基因组信息与分离培养之间的不平衡。通过对公开的宏基因组数据进行分析,除人体相关生境外,地球中其他生境中已发现的微生物绝大多数处于未培养状态^[6,14]。从微生物整体角度来讲,目前已被培养的微生物只占地球微生物总量的极小比例。研究表明,不同环境中已培养微生物的占比存在较大差别,在0.025%~4.3%之间,中位数为0.5%^[14]。候选门级辐射类群(candidate phyla radiation, CPR)细菌和DPANN超门古菌是在上述进程中发现的两大类微生物分支。2013年和2015年,根据组装基因组信息,DPANN超门古菌和CPR类群细菌被定义^[2,15]。系统进化树显示,CPR类群和DPANN超门分别位于细菌域和古菌域外侧,相互毗邻^[16]。具有细胞微小、厌氧/耐氧、难培养、营共生生活、基因组精简、缺少部分核心代谢能力等共性特征^[2,15-17]。目前CPR类群分为2个超门(*Microgenomates*和*Parcubacteria*)和其他独立菌门,至少75个门水平分

支^[16-17];DPANN超门,由最初定名时的5个门增到至少12个菌门^[17-18]。然而仅有极少数CPR和DPANN类群菌株实现了实验室培养,制约了对该类群生态功能、生活方式、进化及演变规律等方面的研究。本文在介绍现有微生物分离培养方法的基础上,对微生物暗物质中的大类群——CPR类群细菌和DPANN超门古菌的分离培养进行总结和分析,以期今后对这两大类独特的微生物暗物质类群的分离培养提供参考。

1 微生物培养的思路

早在1898年,研究人员就已通过对比平板计数和细胞计数两种方法,发现平板培养所得到的微生物数量要远小于环境中微生物实际存在的数量,即所谓的“大平板计数异常”现象^[19]。随后,“寡营养菌(Oligotrophic bacteria)”^[20]“活的不可培养(Viable but nonculturable, VBNC)”状态^[21]和“未培养微生物”^[22]等概念相继被提出,并于1994年获批了“暂定(Candidatus)”分类地位,来描述还未被培养,但序列/基因组信息显示为潜在的新生命分支的微生物^[23]。测序技术的发展与应用更是推动了“微生物暗物质”这一术语的提出,以此来唤醒人们对未培养微生物的重视^[1-2]。虽然微生物分离培养的研究曾一度被一些学者认为是低阶的、过时的^[24-25],但对于此类微生物的可培养尝试从未间断过。

改变培养基成分、浓度,添加微量元素、特殊电子受体和特殊代谢物,避免生长抑制因子的产生,尝试交互共生培养等都是对传统培养方法进行的调整和优化。Rettedal等^[26]通过在培养基中添加混合碳源、微量元素和维生素混合物以及多种复杂小分子化合物,成功分离出多种人体肠道内未培养微生物。Nichols等^[27]发现短肽类物质的添加可以促进海洋砂坪中未培养细菌MSC33的体外生长和富集。氢氧化铁和锰氧化物作为电子受体添加到培养基中可以促进微生物新物种的发现^[28]。信号分子、腐殖酸^[29-30]或处理活性氧的酶类^[31]的添加,过氧化氢等抑制因子的移除^[32]可以提高未培养微生物的可培养成功率。用吉兰糖胶代替琼脂作为凝固剂可以增强未培养微生物

的培养和分离效果^[33-34]。辅助菌株的添加与共培养可以促进难培养微生物的生长富集^[35-36]。

样品极限稀释、培养基稀释培养、滤膜滤过和延长培养时间是分离寡营养菌及未培养菌简单而高效的手段。为了避免微生物之间的相互干扰, Button 等^[37]开发出了样品极限稀释法,将样品稀释至仅有极少量甚至一个微生物细胞,进而在同源的灭菌海水培养基中培养,从中分离出多个新的纯培养微生物。Franklin 等^[38]对污水样品进行梯度稀释和培养,从原液到稀释至 10^{-6} ,发现重建的每一个稀释梯度都会多分离到 2~3 个独特的类群。采用不同孔径滤膜对样品进行预处理是避免培养过程中微生物之间相互干扰,发现新物种的另一个简单而有效的方法^[39]。内蒙古自治区高等学校生物多样性保护与可持续利用重点实验室(本实验室)利用 0.22 μm 滤膜处理内蒙古岱海样品,发现能显著提高可培养细菌新种检出效率。培养基稀释培养方法最早由 Hattori 等^[40]提出,并以此从不同环境中分离培养出大量微生物新物种。2018 年,杜宗军团队采用 1/50 浓度的 2216E 培养基对威海近海表层沉积物进行长时间(最长为 30 d)富集培养,共获得 282 个物种的 1 251 株纯菌,其中包含 97 个潜在新种(1 个新目、1 个新科、16 个新属和 79 个新种)^[41]。Sait 等^[42]通过在培养基中添加木聚糖,延长微生物培养时间至 14 周,成功分离出 10 多株之前未培养的微生物。本实验室结合培养基稀释和延长培养时间,共从内蒙古岱海分离鉴定 170 株菌,其中 44 株菌 16S rRNA 比对相似性 < 98.7%,进一步分析归为 16 个潜在新菌种,其中新种 *Mongoliitalea daihaiensis* X100-76^T 已完成多相分类鉴定^[43]。

2002 年,“原位培养”的概念首次提出,阐明了利用特殊装置将培养从实验室回归到采样环境的想法^[44]。模拟微生物生境及细菌原位培养实验的开展,也被认为是“微生物纯培养研究”重新被重视、复兴的标志^[45]。最初的设计是利用环形不锈钢垫圈和孔径为 0.03 μm 的滤膜组成的“扩散生长盒”装置,将琼脂与极限稀释后的待培养样品进行封闭,之后在模拟的生境中进行培养。由于 0.03 μm 滤膜对微生物的不透过性以及对生长相关活性物质的可透过性特点,实现了扩展室内外化学物质的交流并避免了环境微生物的污染和

干扰^[44]。该方法培养出的微生物数量是传统平板培养方法的 300 倍。随后,基于“扩散生长盒”或类似装置的原位培养研究在不同环境中获得了成功^[46-48]。在此基础上,研究人员又开发出了分离芯片(Isolation chip, Ichip),实现了原位培养的高通量操作^[49-50]。“微生物纯培养研究”复兴的另一个标志是“培养组学(Culturomics)”的提出与兴起^[25, 51]。培养组最早由 Lagier 在 2012 年提出,是综合多重培养条件进行微生物富集培养并利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)及 16S rRNA 基因测序技术进行微生物鉴定的高通量培养方法^[51]。第一篇相关报道研究了 3 个粪便样品的 212 种培养条件,共培养鉴定出 7 个门 117 个属共 340 种微生物,其中 174 种为人体肠道内首次发现^[51]。随后的研究主要集中在肠道等人体相关生境,极大缩小了人体相关生境中微生物宏基因组信息与纯培养之间的不平衡^[25, 45, 52]。

在过去的 10 年中,微生物微包埋、流式细胞分选、微流控芯片等分离技术,荧光原位杂交(FISH)、16S rRNA 基因测序、宏基因组测序、MALDI-TOF 等微生物鉴定技术, Ichip 等高通量培养技术以及 EpicPCR、逆向基因组技术等新方法的应用,原位培养、培养组学等培养理念的创新极大推动了微生物分离培养的研究进展^[53-55]。

2 CPR 和 DPANN 类群特点及难培养原因

CPR 类群细菌和 DPANN 超门古菌是生命之树上的重要分支,约占地球全部细菌和古菌多样性的一半^[18],然而对它们的认识仍处于起步阶段。CPR 类群是细菌域最外侧的单系分支,由 Brown 等于 2015 年根据宏基因组来源的 rRNA 和蛋白序列聚类、命名^[15],融合了早期发现的 OD1 超门(现为 Parcubacteria)和 OP11 超门(现为 Microgenomates),目前包括了至少 75 个菌门的庞大细菌类群^[16-17]。DPANN 超门古菌是古菌域重要的分支,由 Rinke 等^[2]于 2013 年根据单细胞基因组测序所得到的 201 个基因组草图和已有 MAGs 信息,将菌门 *Candidatus* Diapherotrites、*Ca.* Parvarchaeota、*Ca.* Aenigmarchaeota、Nanoarchaeota 和

Ca. Nanohaloarchaeota 聚为一类,并依据最初五个菌门的首字母命名而来。目前 DPANN 超门是至少包括了 12 个菌门的庞大古菌类群^[17-18]。随着研究的深入,已在地下水、土壤、湖泊、泉水、极端环境、海洋、饮用水系统和动物等广泛生境中发现 CPR 和 DPANN 类群的存在^[17,56-58]。CPR 类群细菌和 DPANN 超门古菌在系统进化树上虽各自位于不同域,但相互毗邻^[16],同时有很多共性特征。

2.1 基因组精简及缺少部分关键代谢途径

除 *Ca.* Altiaarchaeales 和其他菌门少数菌株外,绝大多数 CPR 和 DPANN 类群菌株基因组小于 1 Mb^[18]。根据已有基因组信息分析,CPR 和 DPANN 类群菌株缺少完整的脂肪酸合成途径和糖异生途径(缺少葡萄糖-6-磷酸酶),大多数菌株缺少完整的三羧酸循环途径、氨基酸生物合成途径、核苷酸从头合成途径、糖酵解途径(主要缺少

磷酸果糖激酶)和 CRISPR-Cas 免疫系统^[16-17]。但值得注意的是,该类群菌株基因组中约有一半以上的基因未能有效注释,不排除其在某些代谢中发挥作用的可能。

2.2 细胞个体微小

与常规微生物菌体细胞相比,CPR 和 DPANN 类群菌株细胞个体相对微小,可以据此进行初步富集。Castelle 等^[59]利用 1.2 μm 滤膜预过滤,0.2 μm 和 0.1 μm 滤膜收集微生物菌体,发现能有效富集 DPANN 超门菌株;Brown 等^[15]利用 1.2、0.2 和 0.1 μm 滤膜串联过滤地下水,发现 0.1 μm 滤膜富集的 CPR 细菌相对丰度要比 0.2 μm 滤膜多 50% 以上,说明很多 CPR 菌体细胞能通过 0.2 μm 滤膜。对已观察的 CPR 和 DPANN 类群菌株进行统计,通常为球形,直径小于 0.5 μm(表 1)。

表 1 CPR 和 DPANN 类群菌株细胞形态及大小

Table 1 Cell morphology and size of CPR and DPANN

类群/超门	菌株	形态	大小/μm	参考文献
CPR	WWE3、OP11 和 OD1 bacteria	球/椭球	~0.26	[60]
	Saccharibacteria TM7x	球	0.2~0.3	[61]
	Saccharibacteria TM7 HOT346、HOT351、HOT352 和 HOT952	球	<0.5	[62]
	Species of Saccharibacteria	球/球杆	0.1~0.2	[63]
	<i>Ca.</i> Absconditicoccus praedator M39-6	球	~0.3	[64]
	Saccharibacteria TM7i (free cell)	球	0.2~0.3	[65]
DPANN	<i>Nanoarchaeum equitans</i>	球	0.4	[66]
	ARMAN	球	~0.26	[67]
	ARMAN-2 ,4 , and -5	球	~0.4	[68]
	<i>Ca.</i> Nanopusillus acidilobi N7A	球	0.1~0.3	[69]
	<i>Ca.</i> Nanoclepta minutus Ncl-4	球	~0.2	[70]
	<i>Ca.</i> Nanohaloarchaeum antarcticus	球	0.15~1.0	[71]
	<i>Ca.</i> Nanohalobium constans LC1Nh	球	~0.3	[72]
	<i>Ca.</i> Micrarchaeota (ARM-1)	球	0.24~0.44	[73]

对复制速率的测定^[74]和细胞分裂的观察^[75]说明小细胞状态下的 CPR 类群和 DPANN 菌株正处于代谢活跃期而非寡营养下的细胞变小状态。

2.3 营共生生活

根据已有基因组信息分析,大多数 CPR 和 DPANN 类群菌株缺少有氧呼吸链,包括 NADH 脱氢酶和氧化磷酸化复合物 II-IV^[17]。同时,除 *Ca.* Diapherotrites、*Ca.* Micrarchaeota 和 *Ca.* Parvarchaeota 中的个别菌株基因组预测可能独

立生存外,大多数 CPR 和 DPANN 类群菌株基因组预测无法单独生活^[17]。实验室数据支持这一结论(表 2),已获得实验室培养的 CPR 和 DPANN 类群菌株都是与其他 CPR 和 DPANN 类群菌株宿主菌共生生活,不能独立培养,且大多为厌氧/耐氧菌。然而,对这类菌的研究仍处于起步阶段,其生活方式及营养需求还有待深入研究,同时基因组中存在大量未能注释的基因,还不能完全排除独立生存的可能。人

工构建微生物底盘细胞是合成生物学的重要组成部分,目前的策略主要有通过遗传工程手段简化微生物基因组的“Top-down”策略和从头合成生命的“Bottom-up”策略,结合 CPR 类

群和 DPANN 菌株基因组精简的特点,如果能找到独立生活的菌株,将在这两个策略的基础上增加新的思路,对人工构建微生物底盘细胞具有重要意义。

表 2 CPR 和 DPANN 类群已培养菌株分布

Table 2 Distribution of culturable strains in CPR and DPANN

类群/超门	菌株	共生宿主菌	参考文献
CPR	Saccharibacteria TM7x	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	[61]
	Saccharibacteria HOT346	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> , <i>Actinomyces</i> sp. HOT171	[62]
	Saccharibacteria HOT351	<i>Actinomyces</i> sp. HOT897	
	Saccharibacteria HOT352、HOT952	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	
	<i>Ca.</i> Absconditabacteria HOT875	<i>Fusobacterium periodonticum</i> , <i>Parvimonas micra</i>	
	Species of Saccharibacteria (32 strains)	<i>Arachnia propionica</i> , <i>Schaalia meyeri</i> , <i>Actinomyces</i> sp. 897	[63]
	Saccharibacteria strain BB001、AC001、PM004	<i>Actinomyces</i> sp. F0337, <i>Pseudopropionibacterium propionicum</i>	[76]
	<i>Ca.</i> Absconditicoccus praedator M39-6	<i>Halorhodospira halophila</i>	[64]
	Saccharibacteria TM7i	<i>Leucobacter aridocollis</i>	[65]
	DPANN	<i>Nanoarchaeum equitans</i>	<i>Ignicoccus hospitalis</i>
<i>Ca.</i> Nanopusillus acidilobi N7A		<i>Acidilobus</i> sp. 7A	[69]
ARMAN-2-related organism Mia14		<i>Cuniculiplasma divulgatum</i> PM4	[77]
ARMAN		Unconfirmed	[78]
<i>Ca.</i> Nanoclepta minutus Ncl-4		<i>Zestosphaera tikiterensis</i> NZ3	[70]
<i>Ca.</i> Nanohaloarchaeum antarcticus R1		<i>Hrr. lacusprofundi</i>	[71]
<i>Ca.</i> Nanohalobium constans LC1Nh		<i>Halomicrobium</i> sp. LC1Hm	[72]
<i>Ca.</i> Micrarchaeota (ARM-1)		<i>Metallosphaera</i> , <i>Acidianus</i> , <i>Saccharolobus</i>	[73]

2.4 16S rRNA 检测容易被忽视

采用细菌和古菌 16S rRNA 通用引物检测微生物,往往会遗漏许多 CPR 和 DPANN 类群菌株信息。研究表明,很多 CPR 类群菌株 16S rRNA 和 23S rRNA 基因中存在内含子,且在保守区和可变区都有发现^[15]; DPANN 超门中 *Ca.* Aenigmarchaeota、*Ca.* Micrarchaeota、*Ca.* Pacearchaeota 和 *Ca.* Woesearchaeota 16S rRNA 中发现有蛋白编码基因的存在^[17]。同时, CPR 和 DPANN 类群在 16S rRNA 基因序列层面高度可变,很多是在保守区,容易造成 16S rRNA 通用引物不匹配的现象^[17]。

3 CPR 和 DPANN 类群菌株的分离培养

CPR 类群细菌和 DPANN 古菌是自然界中广泛存在的庞大微生物类群,可能占地球全部细菌和古菌多样性的一半,而且这两类菌基因组中约

有一半的基因功能未知,代表着丰富的菌种资源和基因资源。同时,他们的生态功能还未知,代表着未来新发现的巨大机遇。然而厌氧/耐氧,缺少部分核心代谢能力,营共生生活等共性特点,导致 CPR 和 DPANN 类群菌株难培养。缺少实验室分离培养菌株,严重制约着对该类菌在生理生化、代谢潜能、活性物质发掘以及生态功能等方面的深入研究,需要在 CPR 和 DPANN 类群的富集和分离培养方面开展更多的基础研究工作。目前 CPR 类群只有 *Saccharibacteria*^[61-63, 65, 76]、*Ca.* Absconditabacteria^[62] 和 *Ca.* Gracilibacteria^[64] 的部分菌株实现了实验室培养; DPANN 超门只有 Nanoarchaeota^[66, 69-70], *Ca.* Nanohaloarchaeota^[71-72] 和 *Ca.* Micrarchaeota^[73, 77-78] 的部分菌株实现了实验室培养(表 2)。根据 CPR 和 DPANN 类群特点,结合该类群已培养菌株的分离培养过程,针对 CPR 和 DPANN 类群菌株分离培养提出几点建议。

3.1 增加 CPR 和 DPANN 类群生境及多样性的研究

对于不同环境中微生物多样性的研究,多采用基于 16S rRNA 序列的高通量测序技术^[79-81],然而 CPR 和 DPANN 类群菌株由于常有 16S rRNA 通用引物不匹配的现象,容易被遗漏和忽视。目前关于 CPR 和 DPANN 类群生境及多样性的信息多由宏基因组测序、binning 和后续的生信分析获得,但数量还较少,集中在地下水等少数生境^[17,56-58]。充分了解 CPR 和 DPANN 类群在不同生境中的多样性及丰度,分析环境因子的影响是后续分离培养的前提。Saccharibacteria 菌株的实验室培养就是建立在此基础上,最初在泥炭沼泽中发现,命名为“Candidate Division TM7”,之后发现在海水、深海沉积物、地下水、土壤、热泉和动物体内等广泛生境存在,但在口腔中的研究最为深入^[61,82-85]。TM7 常存在于口腔中,丰度在 1% 左右,但在不同类型牙周炎患者口腔中丰度显著升高,部分能达到 21%;同时具有较高的多样性,至少在口腔中发现 5 个不同属 TM7 菌株^[61,84-85]。基于此,唾液样品被用来作为分离 TM7 菌株的研究材料,并首次获得了 TM7x 菌株的实验室培养物^[61],后续的 TM7 H0T346、H0T351、H0T352 和 H0T952 等一系列菌株都是不同口腔环境中分离获得^[62-63,76]。本实验室利用宏基因组测序研究了内蒙古岱海湖水及沉积物样品中 CPR 和 DPANN 的多样性,发现岱海中存在丰度低但丰富的 CPR 和 DPANN 物种资源。

3.2 菌株分离培养过程中增加检测 CPR 和 DPANN 类群存在的环节

CPR 和 DPANN 类群菌株不能独立生活,以及存在 16S rRNA 通用引物不匹配的现象,造成依靠富集、涂布培养、划线分纯和 16S rRNA 检测的常规流程很难发现该类群菌株可能的存在。在富集过程中增加菌群结构变化监测的环节,在分离培养过程中有针对性的增加显微观察,特异性引物筛查的环节可能对发现 CPR 和 DPANN 类群菌株线索,提高分离培养机率有所帮助。Huber 等在分离培养热岩样品中嗜热菌的过程中,分离到一株新的自养硫还原菌 *Ignicoccus hospitalis*,通过显微观察无意间发现表面共生菌的存在,在此基础上培养出 DPANN 的第一株菌 *Nanoarchaeum*

equitans^[66]。*Ca.* Micrarchaeota 的菌株 Mia14 是在富集 Thermoplasmatales 中嗜酸菌的过程中,偶然发现与共生菌属 (*Cuniculiplasma*) 高丰度共存^[77]。*Ca.* Nanohaloarchaeota 菌株 *Ca.* Nanoarchaeum antarcticus R1^[71] 和 *Ca.* Nanohalobium constans LC1Nh^[72] 是分别在分离培养出嗜盐菌 *Hrr. lacusprofundi* 后,以及富集培养几丁质自养嗜盐菌过程中无意间发现。CPR 类群中的菌株 *Ca.* Absconditococcus praedator M39-6 能够实现实验室培养,最初也是基于在所获得的 *Halorhodospira halophila* M39 菌株表面观察到有共生菌的存在^[64]。

3.3 有针对性的分离特定 CPR 和 DPANN 类群菌株更易成功

CPR 细菌和 DPANN 类群古菌分别代表细菌域和古菌域中庞大的独立分支,虽然有很多共性特征,但在具体的代谢活动、宿主菌选择、遗传进化和存在生境等方面有各自的特点。针对其中特定门水平中的菌株进行有针对性的分离培养可能比广泛的筛选培养更容易成功。Saccharibacteria 的菌株 TM7x、H0T346、H0T351、H0T352、H0T952、BB001、AC001、PM004 和 TM7i^[61-63,65,76],*Ca.* Absconditabacteria 的菌株 H0T875^[62] 和 *Ca.* Gracilibacteria 的菌株 *Ca.* Absconditococcus praedator M39-6^[64],Nanoarchaeota 中的菌株 *Ca.* Nanopusillus acidilobi N7A^[69] 和 *Ca.* Nanoclepta minutus Ncl-1^[70],*Ca.* Nanohaloarchaeota 的菌株 *Ca.* Nanohalobium constans LC1Nh^[72] 在分离培养过程中均有针对性的采用特异性引物扩增监测特定菌的存在及生长状况,提高了分离培养的成功率。He 等^[61] 通过分析 Saccharibacteria 的 16S rRNA 序列,发现部分菌株可能具有链霉素抗性,以此推断为依据,通过添加链霉素成功富集分离到了菌株 TM7x。Cross 等^[62] 通过测序数据有针对性的预测 Saccharibacteria 和 *Ca.* Absconditabacteria 的表面蛋白结构,以此设计荧光抗体标记物,成功分离培养出 Saccharibacteria 菌株 H0T346、H0T351、H0T352、H0T952 和 *Ca.* Absconditabacteria 菌株 H0T875。

3.4 明确 CPR 和 DPANN 类群菌株宿主是分离培养的关键

由于不能独立生活,确定 CPR 和 DPANN 类

群菌株的共生宿主是其分离培养的关键。Wurch 等^[69]在黄石公园诺里斯间歇泉盆地的 Cistern 热泉发现存在丰度较高的 Nanoarchaeota(占古菌丰度的 7%)。根据实验室已培养菌株 *Nanoarchaeum equitans* 的共生菌信息及文献报道,推断此类环境中的 Nanoarchaeota 菌株可能以嗜热嗜酸的 Crenarchaeota 菌株为宿主,以此设计最初的富集培养基,最终成功实现菌株 *Ca. Nanopusillus acidilobii* N7A 的实验室培养。美国 Forsyth 研究所的 He 团队和 Dewhirst 团队根据 *Saccharibacteria* 已培养菌株的共生宿主信息,将口腔样品经过 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤富集 CPR 菌株,之后与潜在的宿主共培养,共实现至少 35 株 *Saccharibacteria* 菌株的实验室培养^[63,76]。中科院微生物研究所杜文斌团队利用 EpicPCR 技术确定 *Saccharibacteria* 宿主菌信息,成功从中药蝉蜕中分离出菌株 TM7i^[65]。

3.5 传统分离培养方法与新技术要充分结合

已实现实验室培养的 CPR 和 DPANN 类群菌株,在实验过程中并不是利用某种传统分离培养方法或单纯的采用某一项新技术,往往是采用多种传统的分离培养方法并结合一些新的技术手段实现最终的分离培养。不同孔径滤膜过滤、不同转速离心分离、极限稀释法、富集培养和传代培养等传统培养方法以及流式细胞分选、EpicPCR 技术、逆向基因组技术和 FISH 等新技术手段的有效结合将有助于更多 CPR 和 DPANN 类群菌株的分离培养。其中细胞微小作为 CPR 和 DPANN 类群的一个共同特点,通过采用不同孔径滤膜过滤达到菌株的初步分离与富集,可以作为 CPR 和 DPANN 类群菌株分离培养过程中优先选择的一项简单而有效的手段。

4 展 望

CPR 细菌和 DPANN 古菌类群庞大,分布广泛,同时基因组中约有一半以上的基因未被注释,代表着未来科学发现的重大机遇。目前关于 CPR 和 DPANN 的研究仍处于起步阶段。对其可培养研究不仅有助于加深对该类群菌多样性和生态功能的认识,阐明其生活方式、进化及演变规律,还有利于揭示其独特的代谢途径及功能基因,发现新的天然活性产物,具有重要的科学意义及

应用价值。同时如果在 CPR 或 DPANN 中找到能独立生活的菌株,将对合成生物学中底盘细胞的构建具有重要的指示作用。近些年,我国在发表的微生物新物种数量方面一直处于领先地位,国内也涌现出许多优秀团队。笔者获悉国内的一些实验室已获得 CPR 和 DPANN 类群菌株的培养物,相信不久的将来就会有一些突破性的报道。但该类菌的分离培养研究仍面临巨大挑战。首先,目前对于 CPR 和 DPANN 类群菌株在不同生境中的多样性及丰度研究仍较少,缺少指示性信息,特别是 16S rRNA 通用引物不匹配的现象,容易使 CPR 和 DPANN 类群菌株被遗漏和忽视。其次,未培养微生物的分离培养是一项耗时而艰巨的工作,特别是对于 CPR 和 DPANN 类群菌株。如何找到 CPR 和 DPANN 类群菌株的共生宿主,破解宿主菌生长限制因子并有效而方便的进行实验室培养,同时实现可重复仍然是一道鸿沟。关于 CPR 和 DPANN 类群菌株的可培养研究不应局限于现有的一种或几种方法,应在生境信息基础上选择合适研究材料,在采用滤膜过滤等简单方法的同时应多结合新兴的逆向基因组、EpicPCR 等技术进行有针对性的分离培养。同时“广撒网式”的分离培养也不应放弃,在过程中增加表面共生菌的检测环节可能有意想不到的收获。

参考文献:

- [1] Marcy Y, Ouverney C, Bik EM, et al. Dissecting biological "dark matter" with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(29): 11889-11894.
- [2] Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter [J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 431-437.
- [3] Swan BK, Martinez-Garcia M, Preston CM, et al. Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean [J]. *Science*, 2011, 333(6047): 1296-1300.
- [4] Lynch RC, Darcy JL, Kane NC, et al. Metagenomic evidence for metabolism of trace atmospheric gases by high-elevation desert Actinobacteria [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5(698): 1-13.
- [5] Silver LL. Challenges of antibacterial discovery [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, 24(1): 71-109.
- [6] Lloyd KG, Steen AD, Ladau J, et al. Phylogenetically novel

- uncultured microbial cells dominate earth microbiomes [J]. *mSystems*, 2018, 3(5): e00055-18.
- [7] Lackner G, Peters EE, Helfrich EJM, et al. Insights into the lifestyle of uncultured bacterial natural product factories associated with marine sponges [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(3): E347-E356.
- [8] Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance [J]. *Nature*, 2015, 517(7535): 455-459.
- [9] Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, et al. A new view of the tree of life [J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1(16048): 1-6.
- [10] Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment [J]. *Nature*, 2004, 428(6978): 37-43.
- [11] Anantharaman K, Brown CT, Hug LA, et al. Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system [J]. *Nature Communications*, 2016, 7(13219): 1-11.
- [12] Parks DH, Rinke C, Chuvochina M, et al. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life [J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2(11): 1533-1542.
- [13] Nayfach S, Roux S, Seshadri R, et al. A genomic catalog of Earth's microbiomes [J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(4): 499-509.
- [14] Steen AD, Crits-Christoph A, Carini P, et al. High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured [J]. *ISME Journal*, 2019, 13(12): 3126-3130.
- [15] Brown CT, Hug LA, Thomas BC, et al. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain bacteria [J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 208-U173.
- [16] 陶晔, 邢鹏. 候选门级辐射类群(CPR)细菌研究进展 [J]. *微生物学报*, 2020, 60(6): 1284-1303.
- [17] Castelle CJ, Brown CT, Anantharaman K, et al. Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(10): 629-645.
- [18] Castelle CJ, Méheust R, Jaffe AL, et al. Protein family content uncovers lineage relationships and bacterial pathway maintenance mechanisms in DPANN archaea [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12(660052): 1-13.
- [19] Staley JT, Konopka A. Measurement of in situ activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1985, 39: 321-346.
- [20] Kuznetsov SI, Dubinina GA, Lapteva NA. Biology of oligotrophic bacteria [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1979, 33(1): 377-387.
- [21] Xu HS, Roberts N, Singleton FL, et al. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1982, 8(4): 313-323.
- [22] Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community [J]. *Nature*, 1990, 345(6270): 63-65.
- [23] Murray RG, Schleifer KH. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(1): 174-176.
- [24] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea [J]. *Science*, 2004, 304(5667): 66-74.
- [25] Lagier JC, Hugon P, Khelafia S, et al. 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.
- [26] Røttedal EA, Gumpert H, Sommer MO. Cultivation-based multiplex phenotyping of human gut microbiota allows targeted recovery of previously uncultured bacteria [J]. *Nature Communications*, 2014, 5(4714): 1-9.
- [27] Nichols D, Lewis K, Orjala J, et al. Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow *in vitro* [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4889-4897.
- [28] Köpke B, Wilms R, Engelen B, et al. Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7819-7830.
- [29] Alain K, Querellou J. Cultivating the uncultured: Limits, advances and future challenges [J]. *Extremophiles*, 2009, 13(4): 583-594.
- [30] Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, et al. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4748-4755.
- [31] Kim S, Kang L, Seo J, et al. Culturing the ubiquitous freshwater actinobacterial acI lineage by supplying a biochemical 'helper' catalase [J]. *ISME Journal*, 2019, 13(9): 2252-2263.
- [32] Kato S, Yamagishi A, Daimon S, et al. Isolation of previously uncultured slow-growing bacteria by using a simple modification in preparation of Agar Media [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2018, 84(19): e00807-e00818.
- [33] Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, et al. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, 68(5): 2391-2396.
- [34] Kamagata Y, Tamaki H. Cultivation of uncultured fastidious microbes [J]. *Microbes & Environments*, 2005, 20(2): 85-91.

- [35] Egan M , Motherway MOC , Kilcoyne M , et al. Cross-feeding by *Bifidobacterium breve* UCC2003 during co-cultivation with *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in a mucin-based medium [J]. *BMC Microbiology* , 2014 , 14(282) : 1-14.
- [36] Becker JW , Hogle SL , Rosendo K , et al. Co-culture and biogeography of prochlorococcus and SAR11 [J]. *ISME Journal* , 2019 , 13(6) : 1506-1519.
- [37] Button DK , Schut F , Quang P , et al. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory , procedures , and initial results [J]. *Applied & Environmental Microbiology* , 1993 , 59(3) : 881-891.
- [38] Franklin RB , Garland JL , Bolster CH , et al. Impact of dilution on microbial community structure and functional potential: Comparison of numerical simulations and batch culture experiments [J]. *Applied & Environmental Microbiology* , 2001 , 67(2) : 702-712.
- [39] Liu J , Li B , Wang YY , et al. Passage and community changes of filterable bacteria during microfiltration of a surface water supply [J]. *Environment International* , 2019 , 131(104998) : 1-10.
- [40] Hattori R , Hattori T. Sensitivity to salts and organic compounds of soil bacteria isolated on diluted media [J]. *Journal of General & Applied Microbiology* , 1980 , 26(1) : 1-14.
- [41] Mu DS , Liang QY , Wang XM , et al. Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing [J]. *Microbiome* , 2018 , 6(230) : 1-15.
- [42] Sait M , Hugenholtz P , Janssen PH. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys [J]. *Environmental Microbiology* , 2002 , 4(11) : 654-666.
- [43] Jiang K , Yuan B , Cao CL , et al. *Mongoliitalea daihaiensis* sp. nov. , isolated from Daihai Lake in Inner Mongolia [J]. *Archives of Microbiology* 2021 , 204(1) : 92.
- [44] Kaeberlein T , Lewis K , Epstein SS. Isolating 'uncultivable' microorganisms in pure culture in a simulated natural environment [J]. *Science* , 2002 , 296(5570) : 1127-1129.
- [45] Lagier J , Dubourg G , Million M , et al. Culturing the human microbiota and culturomics [J]. *Nature Reviews Microbiology* , 2018 , 16(9) : 540-550.
- [46] Bollmann A , Lewis K , Epstein SS. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates [J]. *Applied & Environmental Microbiology* , 2007 , 73(20) : 6386-6390.
- [47] Ferrari BC , Winsley T , Gillings M , et al. Cultivating previously uncultured soil bacteria using a soil substrate membrane system [J]. *Nature Protocols* , 2008 , 3(8) : 1261-1269.
- [48] Ben-Dov E , Kramarsky-Winter E , Kushmaro A. An in situ method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique [J]. *FEMS Microbiology Ecology* , 2009 , 68(3) : 363-371.
- [49] Nichols D , Cahoon N , Trakhtenberg EM , et al. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of 'uncultivable' microbial species [J]. *Applied & Environmental Microbiology* , 2010 , 76(8) : 2445-2450.
- [50] Berdy B , Spoering AL , Ling LL , et al. In situ cultivation of previously uncultivable microorganisms using the ichip [J]. *Nature Protocols* , 2017 , 12(10) : 2232-2242.
- [51] Lagier JC , Armougom F , Million M , et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study [J]. *Clinical Microbiology & Infection* , 2012 , 18(12) : 1185-1193.
- [52] Lagier JC , Khelaifia S , Alou MT , et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics [J]. *Nature Microbiology* , 2016 , 1(16203) : 1-8.
- [53] 范念斯 , 齐嵘 , 杨敏. 未培养微生物的培养方法进展 [J]. *应用与环境生物学报* , 2016 , 22(3) : 524-530.
- [54] 周恩民 , 李文均. 未培养微生物研究: 方法、机遇与挑战 [J]. *微生物学报* , 2018 , 58(4) : 706-723.
- [55] 熊盈盈 , 莫祯妮 , 邱树毅 , 等. 未培养环境微生物培养方法的研究进展 [J]. *微生物学通报* , 2021 , 48(5) : 1765-1779.
- [56] Tully BJ , Graham ED , Heidelberg JF. The reconstruction of 2 ,631 draft metagenome-assembled genomes from the global oceans [J]. *Scientific Data* , 2018 , 5: 170203.
- [57] He C , Keren R , Whittaker ML , et al. Genome-resolved metagenomics reveals site-specific diversity of epibiotic CPR bacteria and DPANN archaea in groundwater ecosystems [J]. *Nature Microbiology* , 2021 , 6(3) : 354-365.
- [58] Campos AB , Cavalcante LC , de Azevedo AR , et al. CPR and DPANN have an overlooked role in corals' microbial community structure [J/OL]. *Microbial Ecology* , 1-4. (2021-03-28) [2022-01-24]. DOI: 10. 1007/s00248-021-01737-4.
- [59] Castelle CJ , Wrighton KC , Thomas BC , et al. Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling [J]. *Current Biology* , 2015 , 25(6) : 690-701.
- [60] Luef B , Frischkorn KR , Wrighton KC , et al. Diverse uncultivated ultra-small bacterial cells in groundwater [J]. *Nature Communications* , 2015 , 6(6372) : 1-8.
- [61] He X , Mclean JS , Edlund A , et al. Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2015 , 112(1) : 244-249.
- [62] Cross KL , Campbell JH , Balachandran M , et al. Targeted isolation and cultivation of uncultivated bacteria by reverse genomics [J]. *Nature Biotechnology* , 2019 , 37(11) : 1-8.
- [63] Murugkar PP , Collins AJ , Chen T , et al. Isolation and cultivation of candidate phyla radiation Saccharibacteria (TM7) bac-

- teria in coculture with bacterial hosts [J]. *Journal of Oral Microbiology*, 2020, 12(1814666): 1-20.
- [64] Yakimov MM, Merkel AY, Gaisin VA, et al. Cultivation of a vampire: ‘*Candidatus Absconditicoccus praedator*’ [J/OL]. *Environmental Microbiology*, 1-20. (2021-11-13) [2022-01-24]. DOI: 10.1111/1462-2920.15823.
- [65] Xie B, Wang J, Nie Y, et al. Type IV pili trigger epibiotic association of Saccharibacteria with its bacterial host [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2022, 119(49): e2215990119.
- [66] Huber H, Hohn MJ, Rachel R, et al. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont [J]. *Nature*, 2002, 417(6884): 63-67.
- [67] Comolli LR, Baker BJ, Downing KH, et al. Three-dimensional analysis of the structure and ecology of a novel, ultra-small archaeon [J]. *ISME Journal*, 2009, 3(2): 159-167.
- [68] Baker BJ, Comolli LR, Dick GJ, et al. Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(19): 8806-8811.
- [69] Wurch L, Giannone RJ, Belisle BS, et al. Genomics-informed isolation and characterization of a symbiotic Nanoarchaeota system from a terrestrial geothermal environment [J]. *Nature Communications*, 2016, 7(12115): 1-10.
- [70] St John E, Liu Y, Podar M, et al. A New Symbiotic Nanoarchaeote (*Candidatus Nanoclepta minutus*) and its Host (*Zestospaera tikiterensis* gen. nov. sp. nov.) from a New Zealand Hot Spring [J]. *Systematic & Applied Microbiology*, 2018, 42(1): 94-106.
- [71] Hamm JN, Erdmann S, Eloe-Fadros EA, et al. Unexpected host dependency of Antarctic Nanohaloarchaeota [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(29): 14661-14670.
- [72] La Cono V, Messina E, Rohde M, et al. Symbiosis between nanohaloarchaeon and haloarchaeon is based on utilization of different polysaccharides [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(33): 202007232.
- [73] Sakai HD, Nur N, Kato S, et al. Insight into the symbiotic lifestyle of DPANN archaea revealed by cultivation and genome analyses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(3): e2115449119.
- [74] Brown CT, Olm MR, Thomas BC, et al. Measurement of bacterial replication rates in microbial communities [J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(12): 1256-1263.
- [75] Comolli LR, Banfield JF. Inter-species interconnections in acid mine drainage microbial communities [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5(367): 1-8.
- [76] Bor B, Collins AJ, Murugkar PP, et al. Insights obtained by culturing saccharibacteria with their bacterial hosts [J]. *Journal of Dental Research*, 2020, 99(6): 685-694.
- [77] Golyshina OV, Toshchakov SV, Makarova KS, et al. ‘AR-MAN’ archaea depend on association with euryarchaeal host in culture and in situ [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(60): 1-12.
- [78] Krause S, Bremges A, Münch PC, et al. Characterisation of a stable laboratory co-culture of acidophilic nanoorganisms [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(3289): 1-13.
- [79] Peng M, Zi X, Wang Q. Bacterial community diversity of oil-contaminated soils assessed by high throughput sequencing of 16S rRNA genes [J]. *International Journal of Environmental Research & Public Health*, 2015, 12(10): 12002-12015.
- [80] Guo W, Li Y, Wang L, et al. Evaluation of composition and individual variability of rumen microbiota in yaks by 16S rRNA high-throughput sequencing technology [J]. *Anaerobe*, 2015, 34: 74-79.
- [81] 李华伟, 罗文彬, 许国春, 等. 基于高通量测序的福建北部马铃薯晚疫病株根际土壤细菌群落分析 [J/OL]. *微生物学通报*: 1-15. (2022-01-05) [2022-01-24]. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.210532.
- [82] Rheims H, Spröer C, Rainey FA, et al. Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations [J]. *Microbiology (Reading)*, 1996, 142(10): 2863-2870.
- [83] Hugenholtz P, Tyson GW, Webb RI, et al. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 411-419.
- [84] Brinig MM, Lepp PW, Ouverney CC, et al. Prevalence of bacteria of division TM7 in human subgingival plaque and their association with disease [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1687-1694.
- [85] Liu B, Faller LL, Klitgord N, et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e37919.