The Korean Journal of Microbiology (2011) Vol. 47, No. 3, pp. 179-187
Copyright ⓒ 2011, The Microbiological Society of Korea

총 설

난배양성 토양세균을 위한 신배양기술의 고찰과 향후 발전 방향

김재수
경기대학교 자연과학대학 생명과학과

Review and Future Development of New Culture Methods for Unculturable Soil Bacteria

Jaisoo Kim

Department of Life Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Republic of Korea

(Received August 17, 2011 / Accepted September 14, 2011)

This review describes the characteristics of various unculturable soil bacteria, successfully-cultivating examples of those bacteria, and the diverse factors to be considered for successful cultivation. Most importantly, the selection of proper media is very important because unculturable bacteria demand different types of nutrients at various concentrations of substrates, nitrogens and phosphorus. To develop a new medium to successfully culture unculturable bacteria from soil, molecular ecological studies should be combined together. The inoculum size on a plate is also important: less than 50 bacterial cells are recommended to be plated on a single culture plate. The environmental factors such as pH and salt concentration of the medium need to be adjusted as similar as possible to mimic the original soil environments, and the trial of the various temperatures and extended period of cultivation are better. Since one cannot simply tell about which one was unculturable among a great number of colonies grown on a newly developed medium, some suitable detection methods and fast identification methods are required. Many soil bacteria live with cooperation one another in their communities, so that enrichment such as coculture of using other bacterial metabolites and subsequent pure cultures can also guarantee successful cultivation of the previously uncultured bacteria in soil. Here, this review will discuss for the future perspectives to culture the unculturable soil bacteria.

Keywords: coculture, metagenomics, new culture method, soil bacteria, unculturable

자연에는 수많은 미생물종이 존재한다. 현재까지 추정되는 미생물종은 약 10^5에서 10^6종으로 추정되고 있으며(2, 87), 그 중에 단지 수천 종만이 순수배양을 통해 분리되었고, 약 7,000종의 세균 및 고세균이 계통 분류되었다(52). 토양을 예로 든다면 토양미생물종의 약 1% 미만이 전통적인 배양방법으로 배양이 가능하고 나머지 99% 이상의 종들은 배양이 안 된다. 이를 토양 내 총 세균의 수로 나타낸다면, 약 5% 정도만이 배양이 가능하다고 볼 수 있다. 이렇게 전통적인 배양방법의 한계 때문에 많은 토양세균들의 특성이 아직까지 파악되지 않았고 그로 인해 가능한 많은 자원의 활용이 제한되어 있어 안타까운 실정이다. 전통적인 방법의 약점은 (i) 힘들고, (ii) 시간의 소모가 많으며, (iii) 특히 너무 선택적이라 특별한 미생물의 성장에만 치우쳐있다. 이런 인공배지의 특징은 (i) 극도로 높은 기질의 농도와 (ii) 성장을 위한 특별한 영향성분의 부재 그리고 (iii) 배지에 포함된 저해요소 또는 배지의 치사효과(lethal effect)가 있다. 대부분의 전통적인 방법으로 배양이 가능한 미생물종의 특징은 고체배지에서 콜로니를 형성하거나 액체배지에서 빠른 성장을 통해 탁도를 증가시키는 우점종들이다. 그래서 빠른 성장을 보이는 세균군은 연구가 잘된 편이지만 느린 성장을 보이는 세균군들은 연구가 미진한 편이다.

이러한 문제점들은 분자생물학적 분석기법의 발달로 여러 환경에 존재하는 다양한 미생물의 종들을 구별하고 동정할 수 있는 기틀을 마련하였는데, 대부분 ribosomal RNA 유전자 서열의 차이를 이용해서 미생물군집구조 및 미생물종류를 파악해왔다. 특히 토양은 토양미생물상의 생리적 및 물질대사적 다양성을 반영하는 매우 이질적인 환경을 가지고 있다. 이와 같이 미생물상의 다양성은 유전적 다양성으로 대변되는데 산

* For correspondence. E-mail: jkimtamu@kgu.ac.kr; Tel.: +82-31-249-9648; Fax: +82-31-253-1165

림토양의 경우 12,000-18,000 종에 해당하는 약 4,000-6,000 가지의 유전자(genome equivalents)를 포함하고 있다(88). DNA 염기서열을 이용한 계통분류학적 분석을 통해 거의 모든 토양에 존재하는 4가지의 주요 분류군이 밝혀졌다. 이들은 아강 수준의 *Alphaproteobacteria*와 문 수준의 *Actinobacteria*, *Acidobacteria* 및 *Verrucomicrobia*로 16S rRNA clone library 연구 중 75% 이상을 차지한다(39). 기타 주요 분류군은 *Proteobacteria* 문의 4개의 아강과 문 수준의 *Bacteriodetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi* 및 *Planctomydetes*가 대부분 연구에서 25%-75%를 차지하였다(39). 하지만 이러한 분석방법은 활성이 없는 죽은 미생물까지도 포함한다는 단점이 있고, 다양한 미생물의 존재를 확인하고 그들의 역할을 단순히 예측하는 정도에서 그치므로 각각의 미생물들의 생리적인 특성 및 기능과 역할에 대해 연구하기에는 미흡한 점이 많다. 그러므로 난배양성 미생물의 연구에 새로운 배양기술의 개발이 필요하다.

난배양성 토양세균의 특징

현재 배양이 잘 안 되는 문 수준의 세균들은 *Acidobacteria* (문)의 6개의 아문들인(71), *Chloroflexus*, *Gemmatinonadetes*, *Planctomydetes* (90)와 *Verrucomicrobia* (73)로 밝혀졌고, 또 다른 문인 TM-7 (24, 78)도 배양이 매우 어렵다고 알려졌다. 이러한 균들은 "난배양성(unculturable)"이라 불리고 일반적으로 느리게 자라는 K-strategist (K-전략생물)이다. K-전략생물은 자원이 제한된 환경에서 생존과 성장에 잘 적응한 생물을 일컫는다(3).

배양이 잘 안 되는 이유는 고전적인 배양조건이 미생물성장에 필요한 물리화학적 및 생물학적 조건이 다르기 때문이다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 다음과 같은 4가지 지식을 갖춰야 한다. 첫째는 다양한 생물들에 대한 지식이고, 둘째는 자연서식지의 화학적 원리 파악과, 셋째로는 자연에서 생물학적 및 비생물학적 상호작용, 마지막으로 미생물 수준에서 포괄적으로 생태계에 미치는 영향 등이다(1). 이러한 지식의 부족으로 실수했던 예들 중의 하나는 *Spirochaetes*를 배양할 때 배지 속에 질소고정효소(nitrogenase)을 불활성 시키는 텅스텐(tungsten)을 오랫동안 넣어온 것이다(50). 하지만 최근에 *Spirochaetes*는 질소고정을 통해 성장한다는 것이 밝혀져 텅스텐 없는 배지로 바뀌게 되었다(51). 또 다른 예는 증식배양을 통한 나노고세균(nanoarchaea)의 발견이다(38). 이러한 발견은 다양성연구에 가장 많이 사용되는 universal primer을 이용한 PCR법으로도 발견되지 않았다.

또 다른 실패의 원인 중의 하나는 낮은 생식력을 가진 세균들을 배양하기 위한 인내와 더 정확한 탐색법의 부재이다. 실제로 저영양 서식지의 비성장상태나 휴면상태에서 인공배지를 사용하여 성장상태로 전환하는 것은 위태롭고 스트레스가 많다. 이와 같이 실험실 성장조건으로 적응하기 위해서는 배양시간이 더 필요하다. 경우에 따라서 어떤 미생물은 4개월 이상 걸리기도 한다(97).

한편 자연에 살고 있는 대부분의 미생물들은 군집을 이루고 살고 있고 복잡한 상호관계를 가지고 있다. 최근에 세포 간 의사소통(cell-cell communication)이 많은 관심을 끌고 있는데 특히 quorum sensing으로 알려진 밀도의존 세포신호기작(density-dependent cell-signaling mechanism)에 관한 것이다. 세균들은 종내 수준(intra-species level) 또는 종간 수준(inter-species level)에서 넓은 범위의 신호전달분자(signaling molecule)들에 반응을 한다(12). 이러한 신호전달을 통해서 생물막(biofilm)을 형성한다. 그 외에도 신호전달물질은 독성유발, 이동성 및 항생물질의 생성 등에 관여한다.

마지막으로는 증식-순수분리 과정(enrichment-isolation process)이 비생물적 상호작용(abiotic interaction)을 무시했기 때문이다. 즉 환경이라 일컫는 생지화학적 요인(bio-geochemical factor)들의 붕괴로 인한 스트레스가 원인이 된다. 일례로 자연과는 달리 배지에서 기질농도의 증가는 난배양성 세균들의 성장저해를 일으킬 수 있다(65).

난배양성 토양세균의 배양에 성공하는 방법

배지의 선택

배지의 선택은 배양이 잘 안 되는 토양세균을 순수 분리할 때 매우 중요하다. 즉, 일반적으로 분리된 균의 순수배양에 많이 사용되는 배지는 토양에서 다양한 세균을 분리할 때는 부적합할지도 모른다. 넓은 범위의 종속영양세균(heterotrophic bacteria)의 성장을 지지하는 비선택적 한천배지는 토양에서 다양한 세균의 분리배양에 전통적으로 널리 쓰여 왔다. 그 중에 10배 희석한 trypticase soy agar (0.1× TSA), 다양한 Winogradsky's salt solution (96), 그리고 soil extract agar (25, 64)가 대표적이다.

하지만 이들 전통적인 배지들은 난배양성 토양세균을 분리하는 데는 부적절하다(28, 54, 70). 새롭게 개발된 희석한 nutrient broth (0.01× NB), xylan이 첨가된 VL55 배지(VL55/xylan)와 VL70 배지는 순수분리가 힘든 토양세균의 콜로니 형성에 보다 더 적합하다(18). 특히 VL55와 VL70은 토양수의 무기물성분의 비율을 그대로 모방했으며 *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomydetes*, *Verrucomicrobia*, 및 *Actinobacteria*의 두 개의 아강인 *Acidimicrobidae*와 *Rubrobacteridae*에 속하는 많은 세균의 배양에 성공하였다(42, 45, 71, 72, 74). 이러한 배지들의 특징은 모든 성분들의 농도가 낮다는 것이고 특히 탄소, 질소, 인, 황의 적절한 농도는 각각 2.4, 0.14, 0.014, 0.005 mmol/L로 나타났다.

토양의 모든 세균이 이들 배지에 자라기를 기대할 순 없다. 다양한 토양세균은 다양한 필요조건을 필요로 하든지 서로 다른 성분에 민감할 수 있기 때문에 배지의 범위를 넓히는 것이 더 많은 종류의 토양세균을 성공적으로 배양시킬 수 있다(4, 66, 80). 위에 언급된 배지들의 조성은 Table 1에 표식 되었다.

탄소원과 에너지원의 선택

새로운 배지를 고안할 때 탄소와 에너지원의 선택은 매우 중요하다. 어떤 탄소원과 에너지원을 사용하느냐에 따라 세균

Table 1. Composition of various media used for culturing unculturable soil bacteria

Ingredient	Amount (g) per 1 L DW				
	NB	TSB	WSS[a]	VL55	VL70
2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid				1.95	2.09
Beef Extract	3.00				
Casein		17.00			
Peptone	5.00	2.50			
Soya Bean		3.00			
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$				44.11×10^{-3}	44.11×10^{-3}
K_2HPO_4		2.50	0.40		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$			0.13	49.29×10^{-3}	49.29×10^{-3}
$MnSO_4 \cdot H_2O$			1.52×10^{-3}		
NaCl		5.00			
NH_4NO_3			0.50		
$(NH_4)_2HPO_4$				26.41×10^{-3}	26.41×10^{-3}
$(NH_4)_2SO_4$			0.13		
Selenite-tungstate soln[b]				1 ml	1 ml
Trace Element SL-10[c]				1 ml	1 ml

[a] Winogradsky's salt solution
[b] NaOH, 0.5 g; $Na_2SeO_3 \cdot 5H_20$, 3 mg; $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$, 4 mg; DW, 1,000 ml
[c] HCl, 10 ml; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 190 mg; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 mg; $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 1.5 g; $NaBO_3$, 6 mg; $MnCl_2 \cdot 4H_20$, 100 mg; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_20$, 36 mg; $NiCl_2 \cdot 6H_20$, 24 mg; $ZnCl_2$, 70 mg; DW, 990 ml

수가 달라지고 특히 다양한 중합체 기질(heteropolymeric substrate)의 사용은 단량체 기질(monomeric substrate)을 사용하는 것보다 넓은 범위의 다양한 토양세균을 분리하는데 유용하다(15, 19, 45, 72, 75). 부식산(humic acid) 또한 콜로니 숫자를 증가시키는데 유효하고 실제로 부식산을 포함한 배지에서 *Actinobacteria*의 아문인 *Rubrobacteridae*에 속한 세균을 순수 분리할 수 있었다(57).

기질의 농도 역시 콜로니 형성에 매우 중요하다. 높은 농도의 기질을 가진 배지는 콜로니 형성을 저해하는데 주요 원인은 저농도의 환경조건에 살던 토양세균이 갑자기 실험용 배지의 고농도와 접하면서 기질 가속화 사멸현상(substrate-accelerated death)을 일으키기 때문이다(11, 68). 하지만 모든 기질이 다 그런 것은 아니다. 어떤 기질은 고농도일지라도 억제 또는 독성효과를 가지지 않는다(64).

한천이나 젤라틴으로 만든 고형배지의 경우 기질의 첨가 없이도 콜로니 형성을 잘하기 때문에(45, 64, 95), 낮은 농도의 기질만 첨가해도 고농도의 효과를 가질 수 있다. 그래서 배지의 고형화를 위해 매우 낮은 농도의 유기화합물과 함께 실리카 겔(silica gel)을 사용하지만 기술적으로 더 많은 노력이 필요하다(13).

기타 배지 성분

탄소원과 에너지원이 아닌 다른 배지성분도 성장을 저해할 수 있다. 어떤 세균은 pH 완충용액의 인산염(phosphate)이나(5) 미량원소혼합액(trace element mix)의 구리(copper)와(91, 93) 같이 미약한 농도에 의해서도 성장저해를 받는다. 어떤 해양세균은 좀 더 낮은 농도의 암모니아와 인산염에서 배양성이 증진되었다(22). 배지성분의 미세한 차이로 인한 산화스트레스(oxidative stress)에 노출된 세균의 경우에도 생존에 영향을 미친다(20). 미량원소의 상대적 농도는 표현형(phenotype)에 영향을 미치고(50), 배양성에도 차이를 나타낼 수 있다. 아미노산과 비타민 그리고 K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}와 같은 양이온을 포함하는 넓은 범위의 다른 화합물 역시 낮은 농도에서 조차 일부 토양세균들의 성장을 저해한다(35). 또한 NaCl의 농도에 영향을 받아 유도기(lag period)가 길어지거나 성장이 저해된다(32).

젤화제(Gelling Agent)

토양세균은 일반적으로 수막(water film)에서 서식하지만 표면에 부착한다(29, 34). 액상배양에서도 어떤 세균은 배양관의 벽면에 붙어 자라지만 액상으로 확산되지는 않는다(69). 이러한 이유 때문에 토양세균은 같은 성분의 액상배지보다는 고형배지에서 배양성이 더 뛰어나다(42, 64). 그래서 고화제 없이 액상으로 연속희석을 통해 배양하는 최적확수법(most probable number, MPN)은 고형배지에 비해 배양성이 낮다(42). 게다가 액체배지에서는 다양한 종의 세균들 중 가장 빠르게 자라는 것이 우점하지만 고체배지에서는 거의 다 콜로니를 형성한다. 그러므로 좀 더 많은 분리균주를 얻기 위해서는 액체배지보다는 고체배지를 사용하는 것이 더 유리하다(75).

또한 같은 배지를 사용하더라도 한천의 종류에 따라 콜로니 숫자가 달라진다. 즉 한천의 순도가 높을수록 더 많은 콜로니가 형성되며(33), 높은 순도의 한천도 사용 전에 세척하면 순도를 높일 수 있다(94). 이와 같은 현상은 한천의 어떤 성장억제 인자가 일부 세균의 콜로니 형성을 막기 때문이다. 고화제(solidifying agent)로 한천대신에 gellan gum을 사용하면 배양성이 증가되는데 이는 한천보다 더 선명하기 때문에 매우 작은 콜로니도 쉽게 검출할 수 있기 때문이다(42).

접종량과 상호작용

토양시료와 마찬가지로 해양의 침전물시료는 채취 후 미생물군집이 24시간 안에 급격히 변한다(61). 그래서 시료채취와 접종 사이의 간격을 최소화하는 것이 필요한데 가능하면 4시간 이내가 좋고 온전한 토양덩어리 채로 상온에서 실험실로 운반하는 것이 좋다. 체질(sieving)과 보관은 토양 내 기질의 재분포를 유도하고 영양물질의 쇄도로 r-전략생물(r-strategist)이 급증할 수 있다. 결과적으로 목표 세균의 희석과 항균성 물질의 생성 등으로 다양한 균의 확보에 불리하다.

토양현탁액을 준비할 때 세포손상이나 스트레스가 발생하는데 주로 삼투압(osmotic potential), 이온구성(ionic composition), 산소압(oxygen tension), 전단(shearing) 및 충돌(collision) 등이 원인이다. 삼투보호제(osmoprotectant)인 술폰산염 pH 완충용액(sulfonate pH buffer)을 사용하면 삼투스트레스로부터 세포의 손상을 어느 정도 막을 수 있다(14, 53). 토양을 현탁 시 토양입자에 많은 세균들이 부착돼있기 때문에 초음파로 약하게 처리하면 더 많은 세균 군집을 얻을 수 있다(42).

접종량의 크기 또한 중요한 요소 중의 하나다. 미생물의 상호작용은 순영향과 악영향이 있을 수 있으나 액상배양에서 난배양성 세균을 분리하는 데는 악영향이 더 크다(75). 접종량이 작으면 작을수록 배양성은 더 커지는데 접종량을 10배 희석하면 배양성은 2배 정도 증가한다(13, 19, 41, 43, 44, 64). 이러한 현상은 콜로니들이 너무 근접해있으면 항생물질의 분비나 고성장균에 의한 영양분의 고갈 등에 의해 저성장균의 콜로니 형성을 저해하기 때문이다. 일례로 *Verrucomicrobia* 문의 *Spartobacteria* 강에 속하는 세균들은 약 250개 세포 정도의 접종량으로부터 얻은 plate당 평균 29개의 콜로니 중에서 검출되지 않았지만 10배 희석한 후 평균 5개의 콜로니를 얻었고 이 중에 해당 균의 콜로니를 검출하였다(74). 이러한 결과를 토대로 접종량의 크기는 50개 이하의 세포가 적당하고 표준 9-cm 지름의 plate당 10개 이하의 콜로니를 발생시키도록 노력해야 한다(18, 74).

성장조건: pH, 온도, 공기, 배양기간

배양온도가 낮을수록 대사율은 더 낮아지기 때문에 성장저해물질의 생성율도 더 낮아진다. 그래서 더 많은 콜로니를 생성한다. 예를 들면 30°C 보다는 25°C에서 더 많은 콜로니를 생성하므로 20-25°C가 배양 온도범위로 적절하다(43, 86). 하지만 더 낮은 기후조건에서 시료를 채취했다면 배양온도는 이것보다 더 낮아져야 할 것이다.

pH는 실제 환경과 가깝게 맞춰주는 것이 중요하다. 한 예로 pH가 5.5인 토양에서 세균을 분리할 때 pH 7.0의 배지보다는 pH 5.5의 배지에서 배양성이 훨씬 더 좋았다(71). *Acidobacteria*에 속한 많은 세균들도 약산성에서 많이 분리가 되었고(71) 순수배양도 약산성범위인 pH 4.5-6에서 최적의 성장을 보였다(21).

토양의 공기는 대기보다 CO_2 분압이 높기 때문에 5% CO_2로 높인 공기를 이용해 배양한 결과 일반 공기와 배양성에서 별다른 차이를 보이지 않았다(71). 하지만 독립영양(autotrophic) 세균이나 CO_2가 반응물(reactant)인 이화작용하는 세균에게는 중요할 수 있다(23). 한편 토양에서 O_2의 분압은 대기보다 낮기 때문에 일부 세균들은 저산소(microoxic) 조건에 서식하는 것을 선호할 수 있고 커다란 토양조각은 안과 밖의 산소농도 차이가 심하다(76). 침수된 토양과 같은 곳에서는 산소농도에 민감한 토양세균이 서식한다. 하지만 일반공기와 2% 산소하에서 각각 배양한 결과는 콜로니 개수에 있어서 별다른 차이가 없었다(81).

토양에 주로 많은 K-선택종들은 실험실 조건에서도 성장률이 낮고 원위치(*in situ*)에서도 낮아 우점조건하에서 조차도 배가시간(doubling time)이 100일 이상 걸린다(31). 또한 이들 세균을 눈에 보이는 콜로니 크기까지 도달하기 위해서는 적어도 2주에서 4주 정도의 배양기간이 필요했고(44, 64), 경우에 따라서 난배양성 세균의 콜로니를 얻기 위해 3개월 동안 배양하기도 한다(42). 이렇게 긴 배양기간을 통해 분리에 성공한 세균들은 *Acidobacteria*, *Chloroflexus*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomydetes*와 *Verrucomicrobia* 문 그리고 *Actinobacteria* 문의 아강인 *Acidimicrobidae*와 *Rubrobacteridae*에 속한 세균들이다(18, 45, 72).

어떤 경우에는 접종했을 때는 성장이 느리지만 계대배양을 통해 점점 더 적응해서 배양기간이 줄어들기도 한다(16, 18). 장기간 배양은 배지의 건조를 야기해 콜로니 형성을 저해할 수 있어 얇은 polyethylene zip-lock 주머니를 이용하는 것이 좋다(7).

성장으로의 전환

토양세균은 내생포자(endospore), 외생포자(exospore), 포낭(cyst), 기타 생리학적 및 형태학적으로 다른 세포형태와 같은 비성장형의 장기 생존상태(nongrowing long-term survival state)로 존재 가능하다(48). 포자가 성장상태로 전환하기 위해서는 신호(signal)가 있어야 하고 특히 r-전략생물에게 중요하다. 이러한 신호분자들은 신선한 유기물이 사용 가능할 때 분비되는 일반적으로 흔한 작은 분자들과 많은 미생물학적 배지의 구성성분들이다.

배양액의 상등액(26, 58, 77, 83)이나 순수화합물(6, 8, 10) 같은 특별한 신호분자들의 첨가는 특정 세균군(bacterial group)의 배양효율을 증가시킨다. Acyl-homoserine lactone 혼합물은 해수(8)와 담수세균(10)의 배양성을 개선시켰지만 *Acidobacteria*에 속하는 세균들의 콜로니 형성 빈도를 높인 것 외에는 전반적으로 토양세균에 효과가 없었다(81). 한편 *Proteobacteria*에 속하는 일부 세균은 신호분자로 다른 종류의 Acyl-homoserine lactone을 사용하였고 *Firmicutes*에 속하는 일부 세균들은 전사 후 변형된 15-22개의 아미노산을 가진 펩타이드를 사용하였다(55).

*Micrococcus luteus*는 16내지 17 kDa의 한 단백질을 생성하여 *M. luteus*와 *Actinobactera* 문의 다른 세균 유래 휴면세포의 소생(resuscitation)과 성장을 촉진시킨다(59). 한편 이러한 단백질을 번역하는 유사 유전체들이 같은 문의 다른 세균에서 발견됨으로 또 다른 유형의 세포간(cell-to-cell) 신호분자의 존재가 제기되고 있다(47).

콜로니의 식별

육안으로 구별할 수 있는 콜로니를 얻는 것은 순수분리에 매우 중요하다. 각 토양세균 콜로니의 발달율은 모두 같지 않고 순수배양에서 조차 다르다(40, 56). 몇몇 세균들은 단지 몇 개의 세포로 이루어진 microcolony로 발달되는데 그 중 일부는 더 큰 콜로니로 진행되기도 한다(95). 어떤 경우에는 6개월 후에서야 비로소 지름이 약 50-200 μm의 수많은 minicolony를 형성한다(19). 그러나 이와 같은 micro- 또는 mini-colony가 6개월 이상 길게 배양하면 식별 가능한 콜로니로 발달할지 아니면 자가 성장제한 표현형(self-limiting growth phenotype)을 나타내 성장이 멈출지는 아직 불분명하다.

너무 작아서 육안으로 검출이 힘든 경우 특정 분류군에 적합한 oligonucleotide probe를 사용하거나 현미경을 이용하면 더 많은 순수분리균주를 얻을 수 있다. 예를 들어 *Acidobacteria*의 한 아문에 속하는 세균을 검출하기 위해 사용된 probe를 통해 배양에 의존하지 않는 방식(cultivation-independent method)으로 다양한 세균군집들이 검출되고 이와 동일한 많은 군집들이 배양된 후 순수 분리되었다(71).

한편 모여 자라기보다는 퍼져서 자라길 좋아하는 일부 세균들은 순수분리하기가 매우 힘들다. 이러한 표현형은 해양세균에서 많이 발견되지만(79) 배양된 토양세균에서도 활주(gliding)하거나 확산(spreading) 등을 통해 검출을 불가능하게 만든다(24, 69).

군집배양(Community Culture)

지금까지 배양이 안 된 미생물을 배양하기 위해서는 혼합군집을 이용할 때 가능성이 높다. 실제로 자연환경에서 대부분의 미생물들은 서로 조화를 이루며 한 군집의 구성원으로서 살아가는데 대사물질이나 신호전달물질의 교환 및 제한된 자원의 경쟁 등을 통해 서로 의사소통을 한다(60, 92). 이와 같은 예는 생물막(biofilm)이나 다세포군집(multi-cellular assemblage)에서 찾을 수 있고 환경변화에 적응하기 위한 하나의 수단이다. 또 어떤 경우에는 미생물 군집 내에서 대사중간산물, 미량영양소(비타민 등), 및 킬레이트 시약(chelating agent) 등을 공유하면서 서로 협력한다.

결론적으로 군집배양을 토대로 한 접근은 선택적공생자 또는 영양공생자(facultative or syntrophic organism)를 배양하는데 효과적인 방법이다. 군집배양을 통해 혐기성 슬러지의 고온성 영양공생 혐기성 glutamate 분해 혼합균주(thermophilic syntrophic anaerobic glutmate-degrading consortium)의 증식배양을 성공하였고(67) 이와 유사하게 혐기-호기 순환조건으로 운전되는 회분식반응기(batch reactor)에서도 혼합미생물의 슬러지상 군집의 증식배양도 가능했다(17).

성공적인 신배양기술들

세포포획(Cell Encapsulation) 방법

이 방법은 구형젤(gel microdroplet)을 이용하여 세균세포를 포획(encapsulation)한 후 낮은 영양성분의 유입조건하에서 미세 콜로니(microcolony)를 형성하게 하여 순수 분리하는 방법이다(49, 98). 각 토양환경으로부터 토양시료를 채취한 후 토양시료에 있는 미생물의 수를 파악하고 적당한 배지에 시료를 희석한다. 구형의 젤을 만들기 위한 gelating agent를 첨가한 후 미생물이 들어있는 구형젤을 polymeric membrane로 코팅하기 위해 천연 또는 합성 polymer를 이용한다. 구형젤을 원래의 토양환경에서 적당한 시간 동안 배양(incubation)한 후 구형젤을 잘라서 미생물 콜로니를 현미경으로 관찰한다. 콜로니로부터 난배양성 토양세균을 순수분리하고 분리된 균주들은 96-well microtiter plate로 분주하여 glucose, peptone, yeast extract (1 g/L)와 humic acids extract 0.001% (v/v)가 첨가된 토양 삼출물(soil extract) 상에서 증식 배양한다.

Micromanipulator 방법

이 방법은 micromanipulator를 사용하는 방법(27)으로 각 토양시료를 적당히 희석을 해서 slide glass 위에 얹어 놓은 후에 도립형 현미경[inverse microscope(×1,000)]상에서 bactotip(모세관)을 이용하여 한 개의 세균세포를 분리한 후 각 분리된 세포를 다른 배양용기(culture vessel)에 접종하여 증식 배양한다. 또한 single cell PCR을 사용하여 유전자 분석을 통해 동정도 가능하다.

자연환경모형(Simulated Natural Environment) 방법

이 방법은 해양의 침전물에 적용된 것으로 주로 난배양성 호기성 유기영양세균(aerobic organoheterotroph)의 순수분리에 적합하고(46), 토양시료에도 응용이 가능하다. 먼저 토양시료를 연속으로 희석을 한 다음 토양 삼출물(soil extract)과 따뜻한 한천을 섞는다. 미생물과 섞인 한천을 확산실(diffusion chamber)의 0.03-μm pore membrane 위에 붓고 한천 위는 역시 membrane으로 봉한다(Fig. 1). Membrane은 확산실과 토양 사이에 물질의 이동을 허락하고 미생물은 허락하지 않는다. 완성된 확산실은 실제토양(slurry phase)이 있는 배양실(growth chamber)에 넣고 배양한 후 microcolony가 형성되면 순수배양을 하거나 16S rRNA 유전자의 염기서열분석을 통해 동정한다.

공동배양법(Coculture)

*Thermacetogenium phaeum*은 H_2를 생성하면서 acetate를 느리게 산화시키는 절대혐기성세균(obligately anaerobic organism)이다. 하지만 H_2의 과잉생산으로 산화반응이 저해되기 때문에 H_2를 소비하는 메탄생성균(H_2-scavenging methanogen)과 함께 배양해야 acetate를 이용한 성장이 가능하다(36, 37). 그러므로 H_2 소모성 메탄생성균들이 미리 배양된 증균 배양액을 희석한 후 acetate 산화균들을 접종하여 순수공동배양(pure coculture)을 함으로 목적한 균의 순수분리가 가능하다. 또한 단지 두 종의 세균만을 가지고도 공동배양을 통한 순수분리가 가능하다. 한 종류의 메탄생성균을 포함하는 한천 배지(lawn culture)를 사용하여 영양공생자인 *T. phaeum*의 콜로니 형성

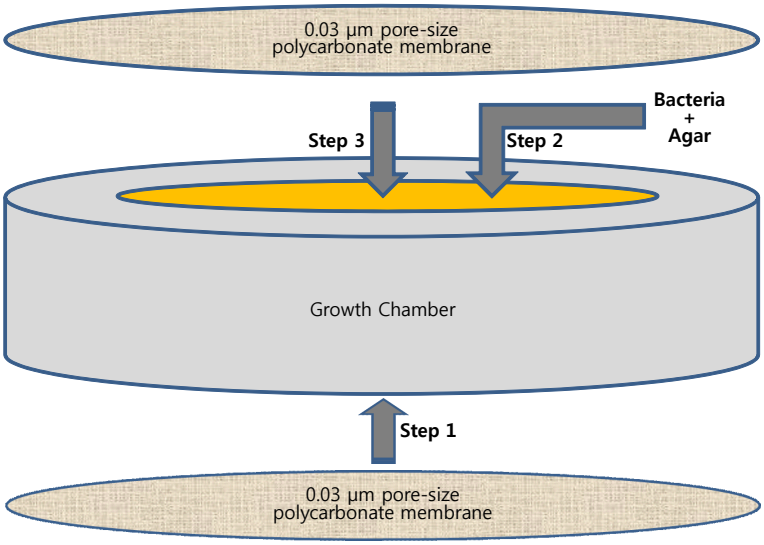

Fig. 1. Diagram of the diffusion growth chamber for *in situ* cultivation of soil microorganisms. The assembling steps are as shown.

을 유도할 수도 있다. 이때 알맞은 상대 메탄생성균과 기질의 선택이 매우 중요하다.

호기성세균의 경우 상호작용기작이 아직 분명히 밝혀지지는 않았지만 세포 간 정보전달(cell-cell communication)과 같이 다른 세균이 생성한 성장인자를 이용한다면 성장이 가능할 것으로 추정된다. 높은 G+C 그람양성균(high G+C Gram-positive group)에 속하는 *Symbiobacterium thermophilum*은 처음에는 한 종류의 *Bacillus* 균주와 공동배양을 통해 순수분리를 수행하였지만(84) 나중에는 이 균주가 생성한 투석물질(dialyzable compound)을 이용하여 무균배양도 가능했다(62, 63, 89). 더욱이 이 균주는 *Bacillus*(속)에만 국한된 것이 아니라 *Bacillaceae*(과)에 속한 다른 종들과도 공동배양이 가능하였다.

활성슬러지에서 분리된 *Catellibacterium nectariphilum*은 NB 배지에서는 잘 자라지 않았지만 *Sphingomonas* 속의 한 세균배양액의 상등액을 첨가함으로 성장이 촉진되었다(85). 이들 상등액을 많이 알려진 보조인자(cofactor)나 아미노산으로는 대체가 불가능하지만 cAMP, *N*-acyl homoserinelactone, siderophore, peptide와 같은 신호물질을 대신 사용하여 순수분리에 성공한 경우도 있다(8, 9, 10, 30).

향후 새로운 배양기술의 전망

토양미생물의 다양성을 유전체적으로 접근하기 위해 토양의 메타게놈 대량 염기서열을 분석한 메타지노믹스(metagenomics) 자료들은 난배양성 세균의 생리학적 특징에 대한 정보를 제공해 주기 때문에(82) 새로운 배양법의 개발에 많은 도움을 줄 것이다. 특히 토양세균에 의해 생산된 2차 대사산물의 폭넓은 조사는 아직 밝혀지지 않은 신호전달분자들을 찾고 특이한 조건에서 배양성을 향상시키는데 중요한 역할을 할 것이다. 이 같은 조사를 난배양성 세균에 접목하려면 토양환경의 메타게놈 연구가 필수적이다. 최근의 next generation sequencing 기술의 도입으로 근 시일 내에 토양 메타게놈의 전체 염기서열정보분석이 수행되어 대량의 토양 미생물 유전정보가 확보될 전망이다.

배지의 최적화를 위해서는 다음과 같은 다양한 보완책이 제기되어야 한다. 첫째로 환경에 대한 보다 더 나은 지식을 기반으로 전자공여체(electron donor), 전자수용체(electron acceptor) 및 핵심요소(key element)의 범위를 한정해야 하고, 둘째로는 신종을 비교검사하기 위한 분자탐침자(molecular probe)의 개발, 그리고 셋째로는 배양 시 드물거나 느리게 자라는 종을 찾아내기 위한 감지능력을 높인 고감도감지기술(high-sensitive method)의 개발이 필요하다.

또한 세포와 세포간의 상호작용을 기반으로 한 순수분리전략이 요구된다. 하나의 균주를 분리하기 위해 고유의 세포 간 의사소통기작을 유지하는 방식을 통해 미생물 군집 내에서 자라게 하는 것이다. 예를 들자면 부유기(planktonic stage)하에서, 구형젤(gel micro-droplet)에 병합된 상태에서, 또는 표면에 부착된 상태에서 생물반응기(bioreactor)로 키우면 가능할 것이다.

하지만 순수분리가 되었다 하더라도 대량배양이 안되면 여러 가지 다른 특성조사에 필요한 생물량(biomass)를 확보하기가 힘들다. 해결방안으로써 한 예를 들자면 자동화된 시스템을 이용해 배양된 구형젤을 유세포분리기(flow cytometry)와 접목해서 모으면 어느 정도의 세포량을 확보할 수 있을 것이다. 그리고 신호전달물질의 부재와 고농도의 기질에 의해 성장저해를 받는 난배양성 세균을 위해서는 자연친화적 생물반응기의 개발이 시급하다.

적요

고찰을 통해 난배양성 토양세균의 특징과 배양에 성공한 사례 및 성공하기 위해 알아야 될 지식들이 무엇인지에 대해 기술하였다. 먼저 배지는 목적한 세균이 토양에서 느리게 성장하다가 실험실의 빠른 성장조건으로 전환하도록 알맞게 선택되어야 하는데 일반적으로 기질, 질소 및 인 등의 농도를 낮게 조절해야 한다. 새로운 배지를 만들기 위해서는 분자생태학적 연구도 병행되어야 한다. 세균 세포 간 음성적 상호작용을 줄이기 위해 평판배양 시 접종량도 평판 당 세포수가 50개 이하로 조절해야 한다. pH나 염농도 같은 성장조건은 실제 환경조건과 맞춰야 하며 배양온도는 낮거나 다양하게 그리고 배양기간은 길게 잡아야 한다. 새로운 배지에서 분리될 수많은 토양 미생물 콜로니들 중에서 단지 몇 개만이 난배양성이므로 이들이 기존에 배양이 되지 않았던 미생물인지를 신속 정확히 검출하는 방법이 필요하다. 또한 많은 토양세균들이 군집 내에서 서로 협력하며 살아가기 때문에 공동배양이나 상등액을 이용해서 토양 미생물을 농화증식하고 이를 순수 분리하면 배양에 성공할 수 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는 2009학년도 경기대학교 학술연구비(일반연구과제) 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. Alain, K. and J. Querellou. 2009. Cutivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* 13, 583-594.
2. Allsopp, D., R.R. Colwell, and D.L. Hawksworth. 1995. Microbial diversity and ecosystem function. CAB International, Wallingford, UK.
3. Andrews, J.H. and R.F. Harris. 1986. r- and K-selection and microbial ecology. *Adv. Microb. Ecol.* 9, 99-147.
4. Balestra, G.M. and I.J. Misaghi. 1997. Increasing the efficiency of the plate count method for estimating bacterial diversity. *J. Microbiol. Methods* 30, 111-137.
5. Bartscht, K., H. Cypionka, and J. Overmann. 1999. Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28, 249-259.
6. Batchelor, S.E., M. Cooper, S.R. Chhabra, L.A. Glover, G.S. Stewart, P. Williams, and J.I. Prosser. 1997. Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2281-2286.
7. Bremner, J.M. and L.A. Douglas. 1971. Use of plastic films for aeration on soil incubation experiments. *Soil Biol. Biochem.* 3, 289-296.
8. Bruns, A., H. Cypionka, and J. Overmann. 2002. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3978-3987.
9. Bruns, A., U. Nübel, H. Cypionka, and J. Overmann. 2003. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of fresh-water bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1980-1989.
10. Bussmann, I., B. Philipp, and B. Schink. 2001. Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. *J. Microbiol. Methods* 47, 41-50.
11. Calcott, P.H. and J.R. Postgate. 1972. On substrate-accelerated death in *Klebsiella aerogenes*. *J. Gen. Microbiol.* 70, 115-122.
12. Camilli, A. and B.L. Bassler. 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 311, 1113-1116.
13. Casida, L.E. 1968. Methods for the isolation and estimation of activity of soil bacteria, pp. 97-122. *In* T.R.G. Gray and D. Parkinson (eds.), The Ecology of Soil Bacteria. Liverpool University Press, Liverpool, UK.
14. Cayley, S., M.T. Record, and B.A. Lewis. 1989. Accumulation of 3 -(N-morpholino)-propanesulfonate by osmotically stressed *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 171, 3597-3602.
15. Chin, K.J., D. Hahn, U. Hengstmann, W. Liesack, and P.H. Janssen. 1999. Characterization and identification of numerically abundant culturable bacteria from the anoxic bulk soil of rice paddy microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5042-5049.
16. Christner, B.C., E. Mosley-Thompson, L.G. Thompson, V. Zagorodnov, K. Sandman, and J.N. Reeve. 2000. Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. *Icarus* 144, 479-485.
17. Crocetti, G.R., J.F. Banfield, J. Keller, P.L. Bond, and L.L. Blackall. 2002. Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology* 148, 3353-3364.
18. Davis, K.E.R., S.J. Joseph, and P.H. Janssen. 2005. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on the culturability and isolation of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 826-834.
19. Davis, K.E.R., P. Sangwan, and P.H. Janssen. 2011. *Acidobacteria*, *Rubrobacteridae* and *Chloroflexi* are abundant among very slow-growing and mini-colony forming soil bacteria. *Environ. Microbiol.* 13, 798-805.
20. De Spiegeleer, P., J. Sermon, A. Lietaert, A. Aertsen, and C.W. Michiels. 2004. Source of tryptone in growth medium affects oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 97, 124-133.
21. Eichorst, S.A., J.A. Breznak, and T.M. Schmidt. 2007. Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum *Acidobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2708-2717.
22. Eilers, H., J. Pernthaler, J. Peplies, F.O. Glöckner, G. Gerdts, and R. Amann. 2001. Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5134-5142.
23. Ensign, S.A., F.J. Small, J.R. Allen, and M.K Sluis. 1998. New roles for CO_2 in the microbial metabolism of a liphatic epoxides and ketones. *Arch. Microbiol.* 169, 179-187.
24. Ferrari, B.C., S.J. Binnerup, and M. Gillings. 2005. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8714-8720.
25. Fischer, H. 1909. Bakteriologisch-chemishe Untersuchungen. Bakteriologischer Teil. *Landw. Jahrb.* 38, 355-364.
26. Freeman, R., J. Dunn, J. Magee, and A. Barrett. 2002. The enhancement of isolation of mycobacteria from a rapid liquid culture system by broth culture supernate of *Micrococcus luteus*. *J. Med. Microbiol.* 51, 92-93.
27. Fröhlich, J. and H. König. 2000. New techniques for the isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 567-572.

28. Furlong, M.A., D.R. Singleton, D.C. Coleman, and W.B. Whitman. 2002. Molecular and culture-based and analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1265-1279.
29. Gray, T.R.G., P. Baxby, I.R. Hill, and M. Goodfellow. 1968. Direct observation of bacteria in soil, pp. 171-197. *In* T.R.G. Gray and D. Parkinson (eds.), The Ecology of Soil Bacteria. Liverpool University Press, Liverpool, UK.
30. Guan, L.L. and K. Kamino. 2001. Bacterial response to siderophore and quorum-sensing chemical signals in the seawater microbial community. *BMC Microbiol.* 1, 27.
31. Harris, D. and E.A. Paul. 1994. Measurements of bacterial growth rates in soil. *Appl. Soil Ecol.* 1, 277-290.
32. Hattori, T. 1976. Plate count of bacteria in soil on a diluted nutrient broth as a culture medium. *Rep. Inst. Agric. Res. Tohoku Univ.* 27, 23-30.
33. Hattori, T. 1980. A note on the effect of different types of agar on plate count of oligotrophic bacteria in soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 26, 373-374.
34. Hattori, T. and R. Hattori. 1976. The physical environment in soil microbiology: an attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 4, 423-461.
35. Hattori, R. and T. Hattori. 1980. Sensitivity to salts and organic compounds of soil bacteria isolated on diluted media. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 26, 1-14.
36. Hattori, S., A.S. Galushko, Y. Kamagata, and B. Schink. 2005. Operation of the CO dehydrogenase/acetyl-CoA pathway both in acetate oxidation and acetate formation by the syntrophically acetate-oxidizing bacterium *Thermacetogenium phaeum*. *J. Bacteriol.* 187, 3471-3476.
37. Hattori, S., Y. Kamagata, S. Hanada, and H. Shoun. 2000. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1601-1609.
38. Huber, H., M.J. Hohn, R. Rachel, T. Fuchs, V.C. Wimmer, and K.O. Stetter. 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417, 63-67.
39. Hugenholtz, P., B.M. Goegel, and N.R. Pace. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180, 4765-4774.
40. Ishikuri, S. and T. Hattori. 1985. Formation of bacterial colonies in successive time intervals. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 870-873.
41. James, N. and M. Sutherland. 1940. Effect of numbers of colonies per plate on the estimate of the bacterial population in soil. *Can. J. Res. Section C.* 18, 347-356.
42. Janssen, P.H., P.S. Yates, B.E. Grinton, P.M. Taylor, and M. Sait. 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2391-2396.
43. Jensen, V. 1962. Studies on the microflora of Danish beech forest soils. I. The dilution plate count technique for enumeration of bacteria and fungi in soil. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Abt. 2.* 116, 13-32.
44. Jensen, V. 1968. The plate count technique, pp. 158-170. *In* T.R.G. Gray and D. Parkinson (eds.), The Ecology of Soil Bacteria. Liverpool University Press, Liverpool, UK.
45. Joseph, S.J., P. Hugenholtz, P. Sangwan, C.A. Osborne, and P.H. Janssen. 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7210-7215.
46. Kaeberlein, T., K. Lewis, and S.S. Epstein. 2002. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296, 1127-1129.
47. Kell, D.B., A.S. Kaprellyants, and A. Grafen. 1995. On pheromones, social behaviour and the functions of secondary metabolism in bacteria. *Trends Ecol. Evolution* 10, 126-129.
48. Kolter, R., D.A. Siegele, and A. Tormo. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 855-874.
49. Kushmaro, A. and S. Geresh. 2004. Method for isolating and culturing unculturable microorganisms. International Applicatiojn Published under the Patent Cooperation Treaty (PCT), International Publication Number: WO 2004/022698 A2.
50. Leadbetter, J.R. 2003. Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 274-281.
51. Lilburn T.G., K.S. Kim, N.E. Ostrom, K.R. Byzek, J.R. Leadbetter, and J.A. Breznak. 2001. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. *Science* 292, 2495-2498.
52. Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap, and D.P. Clark. 2009. Brook Biology of Microorganisms, 12th ed., Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, CA, USA.
53. Mason, T.G. and G. Blunden. 1989. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds of algal origin as alleviators of osmotic stress. *Bot. Mar.* 32, 313-316.
54. McCaig, A.E., S.J. Grayston, J.I. Prosser, and L.A. Glover. 2001. Impact of cultivation on characterization of species composition of soil bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 37-48.
55. Miller, M.B. and B.L. Bassler. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165-199.
56. Mochizuki, M. and T. Hattori. 1986. Kinetics of microcolony formation of a soil olitrophic bacterium, *Agromonas* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38, 51-55.
57. Monciardini, P., L. Cavaletti, P. Schumann, M. Rohde, and S. Donadio. 2003. *Conexibacterwoesii* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class *Actinobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 569-576.
58. Mukamolova, G.V., A.S. Kaprelyants, D.I. Young, M. Young, and D.B. Kell. 1998. A bacterial cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8916-8921.
59. Mukamolova, G.V., N.D. Yanopolskaya, D.B. Kell, and A.S. Kaprelyants. 1998. On resuscitation from the dormant state of *Micrococcus luteus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 237-243.
60. Nadell, C.D., J.B. Xavier, and K.R. Foster. 2009. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 206-224.
61. Novitsky, J.A. 1987. Microbial growth rates and biomass production in a marine sediment: evidence for a very active but mostly nongrowing community. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2368-2372.
62. Ohno, M., I. Okano, T. Watsuji, T. Kakinuma, K. Ueda, and T. Beppu. 1999. Establishing the independent culture of a strictly symbiotic bacterium *Symbiobacterium thermophilum* from its supporting *Bacillus* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1083-1090.
63. Ohno, M., H. Shiratori, M.J. Park, Y. Saitoh, Y. Kumon, N. Yamashita, A. Hirata, H. Nishida, K. Ueda, and T. Beppu. 2000. *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., a symbiotic thermophile that depends on co-culture with a *Bacillus* strain for growth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1829-1832.
64. Olsen, R.A. and L.R. Bakken. 1987. Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting techniques and comparisons between total counts and plate counts within different size groups. *Microb. Ecol.* 13, 59-74.

65. Overmann, J. 2006. Principles of enrichment, isolation, cultivation and preservation of prokaryotes, pp. 80-136. *In* M. Doworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.), The Prokaryotes, 3rd ed. Vol. 1: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology. Springer, New York, NY, USA.
66. Palumbo, A.V., C. Zhang, S. Liu, S.P. Scarborough, S.M. Pfiffner, and T.J. Phelps. 1996. Influence of media on measurement of bacterial populations in the subsurface. *Appl. Biochem. Biotech.* 57/58, 905-914.
67. Plugge, C.M. and A.J.M. Stams. 2002. Enrichment of thermophilic syntrophic anaerobic glutamate-degrading consortia using a dialysis membrane reactor. *Microbiol. Ecol.* 43, 379-387.
68. Postgate, J.R. and J.R. Hunter. 1964. Accelerated death of *Aerobacter aerogenes* starved in the presence of growth limiting substrates. *J. Gen. Microbiol.* 34, 459-473.
69. Reichenbach, H. and M. Dworkin. 1981. Introduction to the glidinh bacteria, pp. 315-327. *In* M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, and H.G. Schlegel (eds.), The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria, vol. 1. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
70. Rösch, C., A. Mergel, and H. Bothe. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3818-3829.
71. Sait, M., K.E.R. Davis, and P.H. Janssen. 2006. Effect of pH on the isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1852-1857.
72. Sait, M., P. Hugenholtz, and P.H. Janssen. 2002. Cultivation of globally-distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ. Microbiol.* 4, 654-666.
73. Sangwan, P., X. Chen, P. Hugenholtz, and P.H. Hanssen. 2004. *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the first pure-culture representative of subdivision two, *Spartobacteria* classis nov., of the phylum *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5875-5881.
74. Sangwan, P., S. Kovac, K.E.R. Davis, M. Sait, and P.H. Janssen. 2005. Detection and cultivation of soil *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8402-8410.
75. Schoenborn, L., P.S. Yates, B.E. Grinton, P. Hugenholtz, and P.H. Janssen. 2004. Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representing the phylum level diversity of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4363-4366.
76. Sexstone, A.J., N.P. Revsbech, T.P. Parkin, and J.M. Tiedje. 1985. Direct measurement oxygen profiles and denitrification rates in soil aggregates. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 49, 645-651.
77. Shleeva, M.O., K. Bagramyan, M.V. Telkov, G.V. Mukamolova, M. Young, D.B. Kell, and A.S. Kaprelyants. 2002. Formation and resuscitation of "non-culturable" cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary. *Microbiology* 148, 1581-1591.
78. Simon, H.M., C.E. Jahn, L.T. Bergerud, M.K. Sliwinski, P.J. Weimer, D.K. Willis, and R.M. Goodman. 2005. Cultivation of mesophilic soil crenarchaeotes in enrichment cultures from plant roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4751-4760.
79. Simu, K. and Å. Hagström. 2004. Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2445-2451.
80. Sørheim, R., V.L. Torsvik, and J. Goksøyr. 1989. Phenotypic divergences between populations of soil bacteria isolated on different media. *Microb. Ecol.* 17, 181-192.
81. Stevenson, B.S., S.A. Eichorst, J.T. Wertz, T.M. Schmidt, and J.A. Breznak. 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4748-4755.
82. Streit, W.R. and R.A. Schmitz. 2004. Metagenomics-the key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 492-498.
83. Sun, Z. and Y. Zhang. 1999. Spent culture supernant of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra improved viability of aged cultures of this strain and allows small inocula to initiate growth. *J. Bacteriol.* 181, 7626-7628.
84. Suzuki, S., S. Horinouchi, and T. Beppu. 1988. Growth of a tryptophanas-producing thermophile, *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., is dependent on coculture with a *Bacillus* sp. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2353-2362.
85. Tanaka, Y., S. Hanada, A. Manome, T. Tsuchida, R. Kurane, K. Nakamura, and Y. Kamagata. 2004. *Catellibacterium nectariphilum* gen. nov., sp. nov., which requires a diffusible compound from a strain related to the genus *Sphingomonas* for vigorous growth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 955-959.
86. Thornton, H.G. 1992. On the development of a standardized agar medium for counting soil bacteria, with especial regard to the repression of spreading colonies. *Ann. Appl. Biol.* 9, 241-274.
87. Tiedje, J.M. 1994. Microbioal diversity: of value to whom? *ASM News* 60, 524-525.
88. Torsvik, V., R. Sørheim, and J. Goksøyr. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment connunities – a review. *J. Ind. Microbiol.* 17, 170-178.
89. Ueda, K., H. Saka, Y. Ishikawa, T. Kato, Y. Takeshita, H. Shiratori, M. Ohno, K. Hosono, M. Wada, and T. Beppu. 2002. Development of a membrane dialysis bioreactor and its application to a large-scale culture of a symbiotic bacterium, *Symbiobacterium thermophilum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 300-305.
90. Wang, J., C. Jenkins, R.I. Webb, and J.A. Fuerst. 2002. Isolation of *Gemmata*-like and *Isophaera*-like planctomycete bacteria from soil and freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 417-422.
91. Waterbury, J.B. 1991. The cyanobacteria-isolation, purification, and identification, pp. 149-196. *In* M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, and H.G. Schlegel (eds.), The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria, vol. 1. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
92. West, S.A., S.P. Diggle, A. Buckling, A. Gardner, and A.S. Griffin. 2007. The social lives of microbes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 53-77.
93. Widdel, F. 1987. New types of acetate-oxidazing, sulfate-reducing *Dessulfobacter* species, *D. hydrogenophilus* sp. nov., *D. latus* sp. nov., and *D. curvatus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 148, 286-291.
94. Widdel, F. and F. Bak. 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing, pp. 3352-3378. *In* A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H Schleifer (eds.), The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, and identification, application, 2nd ed., vol. 4. Springer-Verlag, New York, NY, USA.
95. Winding, A., S.J. Binnerup, and J. Sørensen. 1994. Viability of indigenous soil bacteria assayed by respiratory activity and growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2869-2875.
96. Winogradsky, S. 1949. Microbiologie du Sol. Problèmes et Méthodes. Masson, Paris, France.
97. Zengler, K., H.H. Richnow, R. Rossello-Mora, W. Michaelis, and F. Widdel. 1999. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* 401, 266-269.
98. Zengler, K., G. Toledo, M. Rappé, J. Elkins, E.J. Mathur, J.M. Short, and M. Keller. 2002. Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15681-15686.