

総 説 (特集)

培養できない微生物とは？ したら培養できるのか？ —培養手法の革新—

Innovations in Microbial Cultivation

青 井 議 輝 *
YOSHITERU AOI*

広島大学サステナブル・ディベロップメント実践研究センター 〒739-8527 広島県東広島市鏡山 2-313, VBL402

* TEL & FAX: 082-424-7892

* E-mail: yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp

*Institute for Sustainable Sciences and Development, Hiroshima University,
2-313, Kagamiyama, VBL402, Higashi-hiroshima-shi, Hiroshima 739-8527, Japan*

キーワード：難培養性微生物，分離培養，Microbial dark matter，新規培養手法

Key words: uncultivated microorganisms, microbial cultivation, microbial dark matter, new cultivation methods

(原稿受付 2016 年 9 月 1 日／原稿受理 2016 年 9 月 8 日)

1. はじめに

微生物学（細菌学）の歴史の始まりをどこにするかについては議論が存在する。初めてその存在を確認（計測）したという意味においては、17 世紀後半、顕微鏡の開発と同時に微生物細胞を発見したレーウエンフックに端を発すると言えるであろう。肉眼では見えない、つまり 1 マイクロメートルの小さな生命体を自身が開発した数百倍の倍率を装着した顕微鏡で確認した。しかしレーウエンフックからさかのぼること 150 年余り 16 世紀初頭のフラカストロを無視することはできない。彼は「感知することのできないほど小さな増殖し伝染する粒子」の存在を主張した。結果的に彼の仮説は現代の微生物学の見地からみても驚くほど正確であることは後世に証明されたわけであるが、コッホや彼のグループが完全に微生物の存在を証明し、病気との因果関係を説明するまで感染症の多くは、「瘴気」（有害な物質を含んだ空気）が原因であるとされていた。コッホは、結核菌の発見（ノーベル賞受賞）など細菌学的に重要な発見を多く成し遂げたが、やはり分離培養方法を確立したこと、そしてその意義をコッホの 4 原則として明確にして細菌学の基盤を確立したことにこそある。その基盤は今でも揺るがない。未知微生物の機能や存在意義を知るためには、単一の微生物を分離して純粋培養するというプロセスが必要不可欠であり、プロセスそのものが現代まで続く微生物学に関わる学問体系の基盤になっている。

ところが、今日では圧倒的多数の環境微生物が従来法では培養できないことが一般的に認識されている。実際に、土壌、海洋、淡水など様々な環境から得られたサンプルにおいて、顕微鏡で直接計数して得られた植菌細胞数に比較して寒天平板上でのコロニーの出現数は極めて少ないことは広く知られており¹⁾、それを“Great Plate

Count Anomaly”と呼称する²⁸⁾。しかし、それ自体は近年発見された現象ではなく、植菌数と平板に形成されるコロニー数の矛盾については 120 年前、すなわち寒天平板培養法が登場してからさほど時間が経たないうちにおそらく最初の報告がなされている³³⁾。この非常に単純な現象が、今日「99%の微生物が培養できない」とされている根拠のひとつである。ここで明確にしておかなければいけないことは、「培養されていない微生物（未培養微生物）」と「培養できない（または難培養性微生物）」は同義ではないということである。もっとも培養されていない微生物の相当な割合は「培養困難な微生物」であることは想像に難くない。また、培養困難であることが原因で培養されていない場合もあり得る（多くの研究者がチャレンジしたにもかかわらず）。さらに、Rinke らは、シングルセルゲノム解析技術を活用して正確かつ網羅的な微生物相解析を行い、環境中の微生物の多様性を再解析し、培養されていない系統群の大きな存在をその系統的位相関係とともに明らかにし、同時に未だ分離株が存在しない「門」が多数存在することを明らかにした²⁹⁾。Microbial Dark Matter と称される魅惑的な表現方法でグルーピングされたこれらの微生物だが、やはりそれらの全てが難培養性微生物かどうかは定かではない。そもそも難培養性微生物について科学的に定義することはそれこそ困難である。仮に培養できない微生物は存在していたとしても、それがいかなる条件でも培養できないことを証明することは理論上不可能だからである。コロニー形成率の低さを総称して、または経験的に多くの微生物学者が分離培養に苦労している状況から、さらには未培養系統群の多さから、難培養性微生物というキーワードが環境微生物学分野では一定の存在感を示している。難培養性微生物とはいかなるものなのだろうか？それらはなぜ培養できないのであろうか？そしてどうした

ら培養が可能になるのであろうか？培養できない多くの微生物、すなわちコロニーを形成しなかった微生物（植菌したが一定期間以内に増殖しなかった微生物）は、「菌株固有の事象」とであるというのが、微生物学的には常識的な捉え方である。すなわち、有機物の種類と濃度、無機物の種類と濃度、pH、温度、酸素濃度、ゲル化剤の種類……そしてそれらの組み合わせを考えれば天文学的な種類数の培養条件が考えられる。したがってある特定の培養条件に植菌された環境微生物細胞のうちほんの一部（例えば1%）しか増殖せずコロニーを形成しなかったとしてもなんら不思議なことではないと言える。「ある特定の培養条件に適合しなかったために増殖しなかった」と説明可能だからである。このように培養条件の適合性が微生物の分離培養の効率に最も影響を及ぼす因子であることに疑う余地はない。微生物の難培養性に関する議論はそこをベースに始めるべきである。しかし、あえてそこからさらに一步踏み込んで議論を進めることにする。培養できない理由について一般性のある要因は存在するのであろうか、さらに、それら「培養できない微生物」を劇的に培養可能にする方法論はあり得るのであろうか。本稿では培養できない微生物の本質について議論しつつ、培養手法の革新の可能性について述べることにする。

2. 培養できない微生物とは何か？

さて、培養条件の適合性以外に環境中の微生物の増殖の可否に影響を与える何らかのファクターが存在するのであろうか。Buergerらは環境中の微生物の多くが容易に増殖しないという現象について新たな視点を提供する興味深い実験結果を報告している⁶⁾。彼らは384 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、環境微生物を計算上1細胞になるように限界希釈して非選択培地中に植菌し、その後1年半という長期間にわたって増殖を示したウェルを記録し続けた。すると、1) 1ヶ月以降も新たに増殖を示すウェルは増え続け、その後1年以上経過してもなお新たに増殖を示すが確認され続けること、2) 長期間経って増殖が確認されたウェルから得られた菌株の新規性が高いとは限らないこと（そして新しい培地に再植菌すると一晩で培地が濁るほど増殖すること）、3) 短期間（1ヶ月程度以内）で増殖が確認されたウェルと長期間経ってから増殖が確認されたウェルから同一の種類が検出されることなどを明らかにした。つまり、長期間増殖が確認できない微生物は、増殖速度が著しく遅いことが原因ではなく、また「短期間では増殖しない」性質を共通で保持している種類が存在するというわけではないことをこの実験は明らかにしている。通常は1ヶ月以内に増殖の可否を判別することがほとんどであるが、その場合、各々の微生物種に対する培養条件の適合性だけではなく、「植菌された細胞が増殖を開始するか否か」が最終的に培養の効率に重要な影響を与えること、そしてそれは確率論的な事象であるという結論が導かれる。上記の研究と関連させてEpsteinは、「環境微生物のほとんどは休眠状態を保っており、それらはランダムに覚醒するが、仮に増殖できない条件下で覚醒しても死滅する。しかし、何らかの要因で環境が変化し、たまたま増

殖可能な条件で覚醒した細胞は増殖を開始する。そしてそれらは他の休眠状態の細胞の目覚めを誘導する」という仮説（Scout 仮説）を提唱している¹⁵⁾。つまり、他の微生物の目覚めを感知できない場合（各々の細胞が完全に独立した状態）、覚醒・増殖はランダムに起こるため、上記のような現象が説明可能となる。しかし、難培養性微生物の増殖が実際に上記の仮説に従ってコントロールされていることや、その普遍性を証明するためには、様々な角度からの直接的な実験的証拠が必要であり、それは単純に得られるものでもない。

3. 分離培養手法の革新

3.1 新規培養手法の必要性

培養を伴わない方法論（分子生態解析など）の近年の著しい進展に比べると、培養に関する方法論は150年前から大幅に進展したとは言い難い。事実、今日に至るまで平板培養法が主要な手法であり続けている。一方で、既存の方法論を基盤にしつつ様々な有効な工夫がなされてきたのもまた事実である。培地・基質組成・ゲル化剤、培養条件、シグナル物質の添加、培養時間などの工夫を通じて、これまでに難培養性と認識されていた微生物の分離培養に成功した例も数少なくない^{4,5,11,12,14,18,19,29,30)}。しかし、工夫の域を超えた「新しいコンセプトに基づいた分離培養手法」の登場はきわめて限定的であり、より新しい培養手法の開発は現在の閉塞した状況を劇的に変える可能性を秘めているとも言える。以下に3つの新規手法を解説する。

3.2 in situ 培養手法

人工的な培養環境では増殖できない微生物も、環境中ではいかなる難培養性微生物も増殖するはずである。したがって、実環境中、またはそれを模擬した状態を再現することで通常の培養方法では培養できない難培養性微生物を獲得できる可能性がある。このようなアイデアに基づいて、実環境を模擬する培養手法（in situ 培養法）が考案された。本手法では微生物は通過しない孔径の膜を装着したデバイスを培養チャンバーとしてその内部に培地を充填、環境中からサンプリングした微生物を植菌し、再び元の環境中に設置して一定期間培養を行う方法である（図1）。複数のタイプのデバイスが提案されており、平膜を用いて寒天培地とともに微生物細胞を植菌するタイプ（Diffusion Chamber）^{8,9,13,20)}、Diffusion Chamberを発展させて多数の独立した小さなチャンバーを用いるタイプ（i-Chip）^{25,27)}、中空糸膜を利用して独立した多数のチャンバー内で液体培養を行うタイプ（HFMC）²⁾、平膜上にコロニーを形成させることを目的にするタイプ¹⁰⁾、カプセル化するタイプ⁷⁾などが報告されている。いずれの方法も、対象微生物が実際に増殖している条件、つまり実環境中（複合系）で培養を行うことで、微生物間相互作用や自身が産出する阻害因子を排出しながらの培養が実現可能であることを特徴としている。本培養手法では分離株を得るために通常以下の手順で行う。①微生物細胞を植菌（適切な細胞密度になるように調整）、②所定の環境に設置して in situ 培養を一定

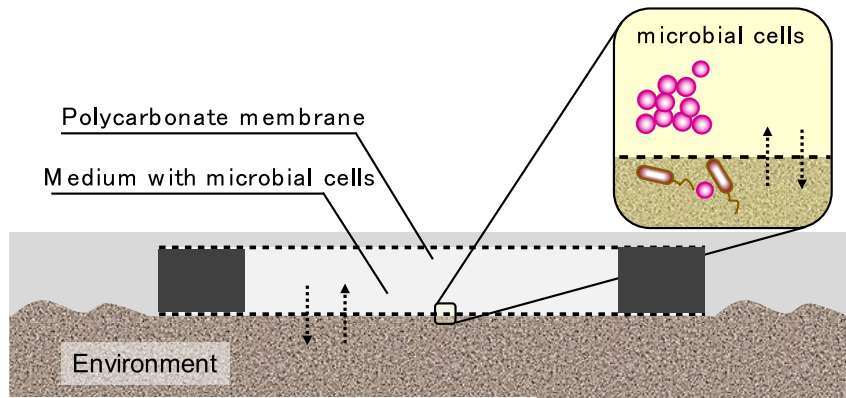


図1. In situ 培養（Diffusion Chamber）の模式図。

期間行う（通常1日–1ヶ月程度）、③ in situ 培養で増殖したサンプルを従来法（平板培養または液体培養）などに再植菌し、二次培養を行う、④必要に応じて分離操作を経て分離株を得る。上記手法の詳細な手順などは以下の文献を参照されたい³⁾。

これまでに報告されている in situ 培養の効果は以下に挙げられる。1) 高い培養効率（Culturability：植菌した全細胞数に対する増殖した細胞の割合）。例えば非選択培地を用いた通常の平板培養法ではコロニー形成率はおおむね1%以下であることが一般的に知られているが、in situ 培養ではその10倍程度を示すこともある^{2,20)}。2) 全く同一のサンプルを用いても、新規性の高い微生物（16S rRNA 遺伝子における既存株との相同性が低い）が獲得される割合が従来法のそれに比べて高い^{2,8)}。3) 分離株の生理学的性質が従来法のそれと異なる^{9,13)}。

以上のように従来法と比較して優れた特徴を持つ in situ 培養であるが、環境中に設置するという性質上、培養条件そのものがブラックボックスとなってしまう。したがって、一体「何が」本質的に重要な因子として働いた結果上記に挙げるような特徴的な分離性能を発揮しているのか全く明らかになっていない。

3.3 ターゲットを選択的に濃縮・分離する方法論

環境中には複数の微生物種が雑多に存在するため、分離対象とする微生物の存在割合は著しく低いことが多い（別途、集積培養などを行わない限り自然の状態でも数十%を占めることは稀である）。したがって、環境サンプルからターゲットを選択的に分離または高度に濃縮することができれば分離効率を格段に上げる可能性がある。しかし培養操作を伴わずに（つまり微生物の増殖に依存しないで）、特定の微生物を生きたまま、選択的に分離・濃縮することは技術的に困難である。そこで筆者らは、セルソーターを用いてターゲット微生物を形態学的な特徴に基づいて、選択的・物理的に分離する新規手法を確立し、そして本手法を用いることで分離株獲得の成功例が極めて少ない亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* の未培養種の分離培養に成功した^{16,32)}。本手法では、2種類の散乱光（前方散乱光および側方散乱光）のシグナル強度比に基づいて細胞集団を分画し、粒子（細胞および細胞の凝集塊）の構造（側方散乱光（SSC）の強度）、大きさ（前方散乱光（FSC）の強度）などの形態学的な特性

に基づいて目的の微生物だけが含まれている画分を探索しそれを選択的に分離する。例えば、前述の *Nitrospira* の場合、簡単には分散しない強固なマイクロコロニー（数十細胞程度の *Nitrospira* だけで構成されている）を形成する特徴がある。またサンプル中には、*Nitrospira* のマイクロコロニー以外にも、1細胞ずつに分散された微生物細胞、*Nitrospira* 以外の微生物を含む凝集塊が含まれる。マイクロコロニーは、単体の細胞より大きく、また構造は他の凝集塊より比較的単純（球形）であることから、前方散乱光のシグナル強度は比較的高く、側方散乱光のシグナル強度は比較的低い画分に現れることが判明した。その解析情報に基づいて99%以上の精度で *Nitrospira* だけを分取することを実証した。分離された細胞は同時にマルチウエルプレート（各ウエル）に任意の細胞数ずつ植菌し、継体培養を繰り返すことで最終的に純培養株を得られる（図2）。一方で、上記 *Nitrospira* の実際の分離培養過程において、植菌された各ウエル（*Nitrospira* のマイクロコロニーを一つずつ植菌）の内、1次培養（約1カ月の期間）で増殖が確認された割合はわずか数%であった。つまり植菌した *Nitrospira* は何らかの理由によって増殖を開始していなかったことが示唆される。また、植菌したサンプルは事前に集積培養を行い *Nitrospira* の占有率（全細胞数に対する *Nitrospira* の細胞数の割合）は50%以上に達したサンプルを用いていた。しかし、*Nitrospira* は超音波などでも容易に分散しないマイクロコロニーを形成しているため、増殖ユニットベース（分散状態の細胞は1細胞を1ユニットとし、マイクロコロニーの場合、一つのマイクロコロニーを1ユニットとして計算する）で計算すると実際には細胞数ベースの占有率に比較して非常に低い占有率（1%程度）になる。したがって、*Nitrospira* を選択的に分離せずに従来する方法論（限界希釈液体培養法）に基づいて分離培養株を得るためには、非現実的な数のマイクロプレートと作業労力を費やす必要があることが計算上推察された（低い培養効率と低い占有率が二重で影響するため）。以上のことから、本手法を用いて対象微生物を選択的に分離して植菌する本手法の有効性は極めて高いと結論づけることができる。

3.4 マイクロ・ナノ成型技術を利用した培養手法

一般的に特定の技術革新はその基となる周辺技術の進

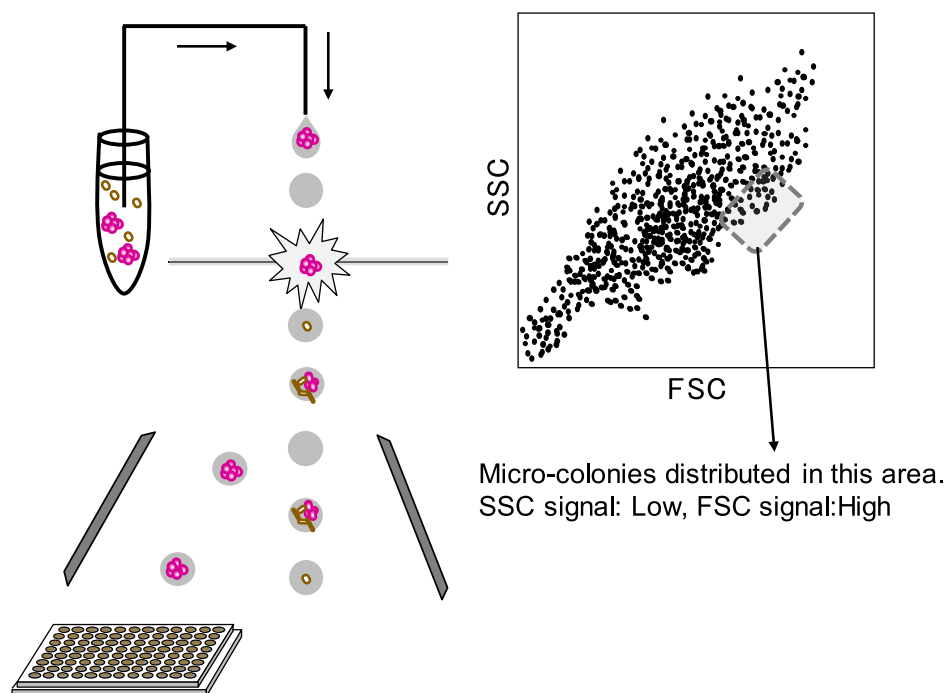


図2. セルソーターを用いたマイクロコロニーの選択的な分取。

展が引きがねになることが多い。そのような観点から、微細加工技術（マイクロ・ナノ成型技術）は微生物の分離培養手法の革新を誘導する可能性を有しており、すでに複数の有効な培養手法の開発が報告されている。微細加工技術によって成形したデバイスを用いることで高効率かつ高感度なスクリーニングの実施が可能になる。また増殖条件の探索や特定微生物の効率的な分離に効果を発揮すると考えられる^{17,22,23)}。

一方で、分離培養のプロセスを単位ごとに分解すると、①サンプリング、②分離、③植菌、④培養、⑤検出、⑥回収の6つのステップから成り立っていることがわかる。実環境中に設置するだけで、その場で分離・培養操作を行う培養デバイスがもし存在すれば、それは究極的な分離培養手法と言える。すなわち上記①から④までのステップを自動的に行うという全く新しいコンセプトである。また実環境中に設置して獲得するという意味においては「微生物を捕まえる罠」と呼称することもできるであろう。筆者はまるで動物を捕まえる罠のように、「えさ（培地）」をしかけ、それに誘われてゲージの内部に対象生物（微生物細胞）が進入すると、入り口が閉まるという仕組みにより分離株を自動的に獲得するデバイスが実現できないかと思案し、まず以下のような原理が成り立つのではないかと仮説を立てた。1) 培地が充填されている比較的大きな容積のチャンパーと外部環境とが一つの細い管でつながっている場合、2) その細い管の断面積が微生物細胞と同じ程度の大きさである場合、3) その管の入り口付近の外部環境に微生物細胞が位置している場合、微生物細胞は拡散によって外部に漏れ出した培地成分を利用して増殖を開始し、細い管の内部を一列に分裂しながらチャンパー方向に進み、チャンパー内でさらに増殖するのではないかと、すなわち結果的に純粋培養株が自動的に獲得されるはずである。一方

で、微生物は運動性を有することが知られており、分裂ではなく運動性によって微生物細胞が管の内部を自由に進むとすると、上記コンセプトが全く成り立たなくなってしまう可能性がある。しかし、隙間の幅がある一定以下であると運動性はキャンセルされ、微生物細胞が移動する手段は分裂だけに限定されるという報告がなされている²⁴⁾。またその報告では、微生物細胞は自身より小さい隙間にも侵入して分裂することが可能であり、その場合自身の細胞を変形して適応するという。以上のことから、管の大きさ（太さ）を正確に制御することで運動性をキャンセルし分裂だけで微生物が移動する条件を整えることは可能であると判断した。

そこで筆者らはナノ・マイクロ成型技術（Electron Beam Lithography と Photo lithography）を用い、上記のコンセプトを実現する全く新しい分離培養デバイスを開発した³¹⁾。デバイスは、培地が充填されている培養チャンパーとそこから外環境につながる細い管（ナノチャンネル：高さ 750–900 nm、幅 600–2000 nm）によって構成されている。環境中の微生物はナノチャンネル内を1列に分裂を繰り返しながら進み、培養チャンパーに到達し、そこで検出可能レベルまで増殖する。細胞が管内に侵入して分裂するとナノチャンネルはその細胞によって塞がり他の微生物は侵入できないため、純粋菌株が得られるという原理を実現するための構造である（図3）。実際に同原理に基づいて混合培養系から単一の種類を分離することは既の実証されており、現在、筆者らは環境微生物の分離培養への適用性を調査している。

本手法はコンセプトレベルで新しい。なぜなら、現存する全ての分離培養手法は、①限界希釈培養法または、②平板培養法に立脚していると言っても過言ではないからである。すなわち従来の方法論では微生物細胞は人為的に分離されて所定の培地に植菌される（平板培養の場

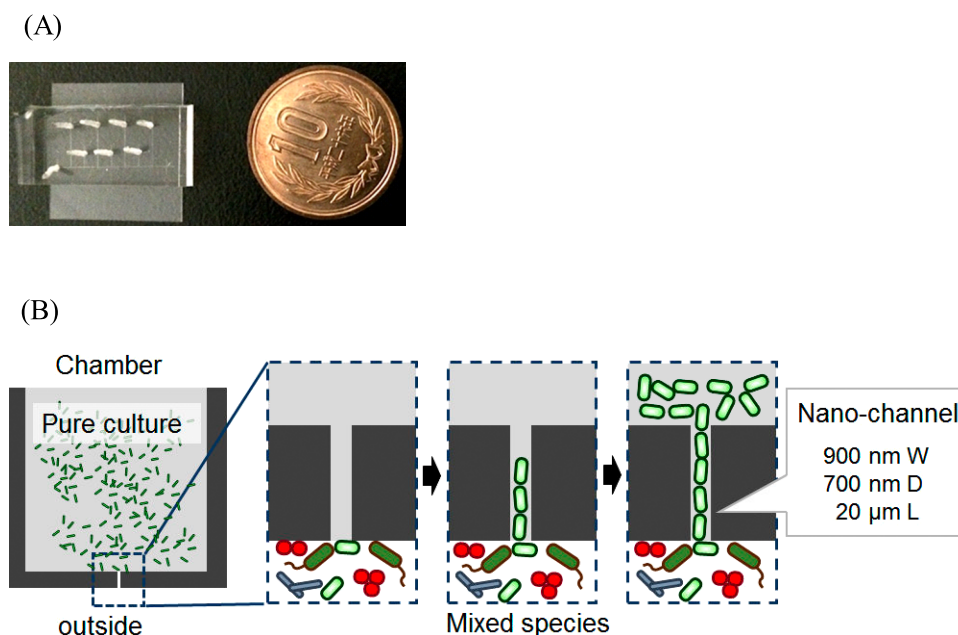


図3. 微生物を自動的に分離・培養するデバイス。プロトタイプ全体像 (A), 構造および分離メカニズム (B)

合は植菌プロセスと分離プロセスを同時に行う)。ところが、本手法は「微生物細胞自身が能動的に分離して増殖する」という観点で、従来の方法論とは全く異なる第3の方法として定義することが可能であり、その特異性や構造を生かして従来の分離培養法では想定することもできなかったような、全く新しい使用方法や用途が期待される。

4. ま と め

この20年余りで著しい発展を遂げた、培養を伴わない微生物解析手法すなわち分子生態解析技術やゲノムベースの解析技術の普及により、分離培養株を得ることなく環境中の微生物についての理解が進んでいる。しかし、依然として分離培養の必要性が色あせることはない。また、微生物の利用を中心とした産業的応用の観点から、難培養性微生物を「培養」というキーワードで再開拓することは実は大きな可能性を秘めているといえる。最近、原理的には耐性菌が出現しにくい、画期的な抗生物質である *Teixobactin* が発見された²¹⁾。それは前述した新規分離培養手法 (in situ 培養) を経て獲得された菌株から発見されたものである。*Teixobactin* を産生する菌株 *Eleftheria terrae* が新規培養手法だからこそ獲得できたのか否かについては定かではないが、本研究結果は、1) 未培養微生物には産業的に多くの有用な菌株が未利用のまま眠っており、それを積極的に開拓するに値するポテンシャルを有していること、そして2) 新規分離培養手法の開発が新たな未利用資源の開拓につながり、産業的に有用な基盤技術と成り得ることを示しているといえるのではないだろうか。

しかし、たとえ分離培養の必要性は認識されていたとしても、成功する見込みの低さから培養そのものを回避しようとする傾向すらあるのも事実である。一方で、分離培養手法の革新はそういった閉塞的な状況を変えられ

る数少ない有効なアプローチと言える。また、「難培養性」の本質的な要因の一端が少しずつ明らかになることは、微生物学研究の進展に大きく寄与するはずである。すなわち、分離培養技術の革新を試みる努力そのものが、「微生物はなぜ培養できないか」という問いの答えを導く最短のプロセスでもあると言えるのではないだろうか。そしてそれこそが、未知なる環境微生物のポテンシャルを明らかにし、そして最大限引き出す起爆剤の一つになるのではないかと考えられる。

文 献

- 1) Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169.
- 2) Aoi, Y., T. Kinoshita, T. Hata, H. Ohta, H. Obokata, and S. Tsuneda. 2009. Hollow-fiber membrane chamber as a device for in situ environmental cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3826–3833.
- 3) Aoi, Y. and S. Epstein. 2016. New devices for cultivation. pp. 2.1.3-1–2.1.3-8. In M. Yates, C. Nakatsu, R. Miller, and S. Pillai (eds.), *Manual of Environmental Microbiology* Fourth Edition ASM Press, Washington D.C. USA.
- 4) 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.
- 5) Bruns, A., U. Nubel, H. Cypionka, and J. Overmann. 2003. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1980–1989.
- 6) Buerger, S., A. Spoering, E. Gavrich, C. Leslin, L. Ling, and S.S. Epstein. 2012. Microbial scout hypothesis and microbial discovery. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 3229–3233.
- 7) Ben-Dov, E., E. Kramarsky-Winter, and A. Kushmaro. 2009. An in situ method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68: 363–371.
- 8) Bollmann, A., K. Lewis, and S.S. Epstein. 2007. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the

- diversity of recovered isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6386–6390.
- 9) Bollmann, A., A.V. Palumbo, K. Lewis, and S.S. Epstein. 2010. Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 7413–7419.
 - 10) 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.
 - 11) Connon, S.A. and S.J. Giovannoni. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3878–3885.
 - 12) Cho, J.C. and S.J. Giovannoni. 2004. Cultivation and Growth Characteristics of a Diverse Group of Oligotrophic Marine Gammaproteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 432–440.
 - 13) Jung, D., Y. Aoi, and S.S. Epstein. In situ cultivation allows recovery of bacterial types competitive in their natural environment. *Microbes Environ.* (in press).
 - 14) Davis, K.E.R., S.J. Joseph, and P.H. Janssen. 2005. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 826–834.
 - 15) Epstein, S.S. 2009. Microbial Awakenings. *Nature.* 457: 1083.
 - 16) Fujitani, H., N. Ushiki, S. Tsuneda, and Y. Aoi. 2014. Isolation of sublineage I *Nitrospira* by a novel cultivation strategy. *Environ. Microbiol.* 16: 3030–3040.
 - 17) Ingham, C.J., A. Sprengels, J. Bomer, D. Molenaar, A. van den Berg, J.E. van Hylckama Vlieg, and W.M. de Vos. 2007. The micro-Petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 18217–18222.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) Kaeberlein, T., K. Lewis, and S.S. Epstein. 2002. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science.* 296: 1127–1129.
 - 21) Ling, L.L., T. Schneider, A.J. Peoples, A.L. Spoering, I. Engels, B.P. Conlon, A. Mueller, T.F. Schäberle, D.E. Hughes, S. Epstein, M. Jones, L. Lazarides, V.A. Steadman, D.R. Cohen, C.R. Felix, K.A. Fetterman, W.P. Millett, A.G. Nitti, A.M. Zullo, C. Chen, and K. Lewis. 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature.* 517: 455–459.
 - 22) Liu, W., H.J. Kim, E.M. Lucchetta, W. Du, R.F. Ismagilov. 2009. Isolation, incubation, and parallel functional testing and identification by FISH of rare microbial single-copy cells from multi-species mixtures using the combination of chemistride and stochastic confinement. *Lab. Chip.* 9: 2153–2162.
 - 23) Ma, L., J. Kim, R. Hatzepichler, M.A. Karymov, N. Hubert, I.M. Hanan, E.B. Chang, and R.F. Ismagilov. 2014. Gene-targeted microfluidic cultivation validated by isolation of a gut bacterium listed in Human Microbiome Project’s Most Wanted taxa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: 9768–9773.
 - 24) Männik, J., D. Rosalie, P. Galajda, J.E. Keymer, and C. Dekker. 2009. Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 14861–14866.
 - 25) Nichols, D., N. Cahoon, E.M. Trakhtenberg, L. Pham, A. Mehta, A. Belanger, T. Kanigan, K. Lewis, and S.S. Epstein. 2010. Use of Ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 2445–2450.
 - 26) Rinke, C., P. Schwientek, A. Sczyrba, N.N. Ivanova, I.J. Anderson, J.F. Cheng, A. Darling, S. Malfatti, B.K. Swan, E.A. Gies, J.A. Dodsworth, B.P. Hedlund, G. Tsiamis, S.M. Sievert, W.T. Liu, J.A. Eisen, S.J. Hallam, N.C. Kyrpides, R. Stepanauskas, E.M. Rubin, P. Hugenholtz, and T. Woyke. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature.* 499: 431–437.
 - 27) Sizova, M.V., T. Hohmann, A. Hazen, B.J. Paster, S.R. Halem, C.M. Murphy, N.S. Panikov, and S.S. Epstein. 2012. Cultivability of oral bacteria: New approaches for isolation of previously uncultivated species. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 194–203.
 - 28) Staley, J.T. and A. Konopka. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39: 321–346.
 - 29) 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. *Annu. Rev. Microbiol.* 70: 4748–4755.
 - 30) Tamaki, H., Y. Sekiguchi, S. Hanada, K. Nakamura, N. Nomura, M. Matsumura, and Y. Kamagata. 2005. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2162–2169.
 - 31) Tandogan, N., P.N. Abadian, S. Epstein, Y. Aoi, and E.D. Goluch. 2014. Isolation of Microorganisms using Sub-Micrometer Constrictions. *Plos ONE.* 9: e101429.
 - 32) Ushiki, N., H. Fujitani, Y. Aoi, and S. Tsuneda. 2013. Isolation of *Nitrospira* belonging to Sublineage II from a Wastewater Treatment Plant. *Microbes Environ.* 28: 346–353.
 - 33) Winterberg, H. 1898. Zur Methodik der Bakterienzahlung. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 29: 75–93.