



## 基于流式细胞仪高通量分选的深海微生物单细胞培养

阮楚晋<sup>1,4</sup>, 郑小伟<sup>1</sup>, 王丽<sup>1</sup>, 王铤<sup>1</sup>, 朱雅新<sup>1</sup>, 王剑<sup>1</sup>, 贡娟莉<sup>1</sup>, 董志扬<sup>1</sup>,  
陆祖军<sup>4</sup>, 黄英<sup>1</sup>, 杜文斌<sup>1,3</sup>, 黄力<sup>1,2</sup>, 戴欣<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

<sup>2</sup>中国科学院大学生命科学院, 北京 100049

<sup>3</sup>中国科学院大学存济医学院, 北京 100049

<sup>4</sup>广西师范大学生命科学学院, 广西 桂林 541006

**摘要:**【目的】建立适用于海洋微生物的流式细胞分选与高通量单细胞培养的方法, 通过该方法从印度洋深海样品中分离微生物纯培养菌株。【方法】利用流式细胞仪单细胞分选功能, 以前向角(FSC)和侧向角(SSC)散射光信号代替荧光信号作为分选逻辑, 对深海水体和沉积物样品中微生物进行单细胞高通量分选和培养。【结果】确定了流式细胞分选的区域和条件, 发现所建立方法适于分离海洋水体微生物, 而不是沉积物微生物。从印度洋深海水体样品中获得61个潜在新菌株, 分属于6个新属种, 占分离菌株总数的26.29%, 其16S rRNA基因序列与已培养的模式菌株相似性为89.79%–95.37%。【结论】本研究所建立的方法有助于提高发现海洋微生物新物种的效率, 获得更多新的海洋微生物资源。

**关键词:** 微生物培养, 单细胞, 流式细胞仪, 深海

海洋占地球面积的 70%, 而海洋面积的 75% 以上是水深大于 1000 m 的深海。长期生活在高压、低温(或高温)、无光环境的深海微生物, 具有适应该环境的独特代谢途径及防御机制<sup>[1]</sup>。破解深海微生物及其遗传机制和代谢特点, 揭示它们在海洋生态环境中的作用及机制, 有助于加深对生命过程特别是极端生命和低能量生命过程

的认识。另外, 深海微生物丰富的多样性和独特的代谢能力, 使其成为解决气候、能源、环境、医药等问题不可或缺的资源宝库。研究表明, 环境中(包括海洋)绝大多数微生物仍未可培养<sup>[2]</sup>, 尽管基于元基因组、元转录组学的研究工作有助于揭示海洋微生物在物种、代谢潜力以及生态功能等方面存在的巨大多样性<sup>[3–4]</sup>, 但由于缺乏可培养

基金项目: 国家自然科学基金(91951105); 中国大洋矿产资源研究开发协会十三五项目(DY135-B-02); “科学”号高端用户项目(KEXUE2019GZ05)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807418; E-mail: daixin@im.ac.cn

收稿日期: 2020-07-15; 修回日期: 2020-10-17; 网络出版日期: 2021-01-15

的菌株,使人们证实这些微生物的生理代谢特点并验证基于它们基因组分析形成的假说,也限制了对其实用价值的深入研究和发掘<sup>[5]</sup>。

在过去的 20 多年里,人们先后尝试了一系列的海洋微生物分离培养策略及技术,如稀释培养(dilution culture)<sup>[6]</sup>、极限稀释(dilution-to-extinction)的高通量培养(high-throughput culturing, HTC)<sup>[7]</sup>、微胶囊包埋培养(microencapsulation cultivation)<sup>[8]</sup>、扩散盒培养(diffusion chamber)<sup>[9]</sup>、微生物分离芯片(isolation chip)<sup>[10]</sup>培养等,这些方法提高了海洋微生物的可培养率<sup>[5]</sup>,使人们获得了诸多新微生物纯培养类群。事实上,微生物的分离培养不再是一种过时的工作,而是微生物学家今天面临的主要挑战,也是一个快速发展的研究领域<sup>[11]</sup>。

分离是获得纯培养物过程中最关键的一步<sup>[12]</sup>。常见的微生物单细胞分离分选方法有传统的涂布或划线(spreading 或 streaking)分离<sup>[12]</sup>、基于显微操作的光镊(optical tweezers)分离<sup>[13]</sup>、液体连续梯度稀释(liquid serial dilution)分离以及结合液滴微流控(droplet-based microfluidics) (包括结合拉曼等检测技术的微流控分离培养)<sup>[14-15]</sup>和流式细胞术(flow cytometry)<sup>[16]</sup>等高通量微体积的分选和分离方法。其中,流式细胞技术是利用流式细胞仪进行的一种单细胞定量分析和分选技术<sup>[17]</sup>,该技术主要用于细胞特别是哺乳动物细胞的遗传代谢和表达差异分析,近年也有用于微生物细胞检测的报道<sup>[18-20]</sup>,以流式细胞仪与荧光激活的细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)为主,从而提高单细胞分选的速度和效率。2001-2002 年,Manome 和 Zengler 的实验室<sup>[21-22]</sup>率先将流式细胞术与凝胶微滴(gel microdroplet, GMD)结合进行环境样品微生物单细胞分选和培

养。由于自然环境中大部分微生物本身并不含有荧光色素或分子,而与微生物细胞组分(如 DNA 或蛋白质)特异结合的荧光染料往往会抑制后续的细胞培养,因此无标记的流式细胞分选(label-free flow cytometric cell sorting)技术成为环境样品微生物单细胞高通量分离和培养的首选<sup>[23]</sup>。目前这一技术主要集中应用在对活性污泥等样品中特定类群微生物菌株,特别是一些具有明显形态特征的菌株进行分选与培养<sup>[24-27]</sup>。Huys 和 Raes (2018)认为,该技术可以扩展到从各种环境样品中分离缺乏典型形态(atypical morphology)的微生物细胞,从而实现对未培养或未知微生物的高通量分选和培养<sup>[23]</sup>。

本研究主要探索和建立适用于海洋微生物的结合流式细胞分选与高通量单细胞培养方法,通过确定深海微生物细胞在流式细胞仪中产生前向角(FSC)散射光和侧向角(SSC)散射光信号位置,从印度洋深海样品中分离微生物,并对分选获得的单细胞培养物进行 16S rRNA 基因的多样性分析,与常规平板分离获得菌株的多样性和新颖性进行比较,并揭示基于流式细胞术用于深海微生物单细胞高通量分选和培养的特点和适用性。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品来源

本研究所用样品,由中国大洋第 28 航次(2013 年)和第 39 航次(2016 年)采集自西南印度洋,其站位信息见表 1。深海水体分别采用电视多管(TVM)和温盐深仪(CTD)采集,沉积物由电视抓斗(Deposit-Grab with TV)采集,样品密封分别放入无菌 50 mL 离心管和样品杯中,4 °C 冷藏备用。

表 1. 样品站位信息  
Table 1. Information of the sampling sites

Sample	Longitude	Latitude	Depth/m	Type
28II-S030-TVMC01	E 69°20'31.56"	N 4°0'10.08"	4213.00	Water
39V-IB-S007CTD02	E 78°53'22.16"	S 24°22'12.98"	4349.55	Water
39IV-SWIR-S011TVG07	E 54°12'51.48"	S 34°58'1.45"	3269.63	Sediment

## 1.2 参比菌株特性及培养基

大肠杆菌(*Escherichia coli* K12): 1.0  $\mu\text{m}$ ×2.0  $\mu\text{m}$  杆状, 鞭毛细菌; 由中国普通菌种保藏中心提供, 培养基为 Luria-Bertani (LB)培养基<sup>[28]</sup>。

硫化叶菌(*Sulfolobus* sp. A20): 0.8–1.0  $\mu\text{m}$  不规则球状古菌, 为本实验室分离自哥斯达黎加热泉<sup>[29]</sup>; 培养基为 Zillig 培养基<sup>[30]</sup>。

海杆菌(*Marinobacter* sp. IM-B4)和亚硫酸盐杆菌(*Sulfitobacter* sp. DY-297), 分别为 0.6  $\mu\text{m}$ ×2.0  $\mu\text{m}$  和 0.9  $\mu\text{m}$ ×1.3  $\mu\text{m}$ , 均为本实验室分离自深海沉积物的海洋细菌; 培养基为 ZoBell 2216E 培养基(Difco, Becton Dickinson)<sup>[31]</sup>。

分离自深海样品的微生物, 采用改良的海洋 M13 培养基<sup>[32]</sup>进行培养。

## 1.3 微生物单细胞分选和培养

**1.3.1 分选区域:** 单细胞分选设备为超速流式细胞仪(MoFlo XDP, 美国 Beckman Coulter 公司)。

(1) 参比菌株样品制备: 活化后的大肠杆菌 K12 于 LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 摇床培养 4 h; 活化后的海杆菌 IM-B4 和亚硫酸盐杆菌 DY297 于 2216E 液体培养基中 30 °C、180 r/min 摇床培养 24 h; 硫化叶菌 A20 于 Zillig 培养基中 75 °C、150 r/min 摇床培养 72 h。上述细胞(处于对数生长期)用荧光染料 SYBR Ggreen 于 4 °C 染色 20 min。

(2) 参比菌株分布区域的确定: 使用流式细

胞仪的分选功能, 根据细胞产生前向角(FSC)散射光和侧向角(SSC)散射光信号以确定其主要分布区域。分选前, 先按照流式细胞仪光路校准说明校准仪器光路; 根据流式细胞仪 Dropdelay 分选程序校准分选通路; 按照 Cyclone 使用程序调整 96 孔板的位置, 并建立单细胞分选程序。参比菌株上样后, 采用流式细胞仪信号分析软件 Summit 5.2 分析荧光信号区域细胞的 FSC 和 SSC 信号(散射光信号取 Log height 值)。

(3) 分选过程污染的防止: 所有单细胞分选工作均在中国科学院微生物研究所单细胞分析平台万级洁净室中完成。分选样品更换前, 用次氯酸钠进样 5 min, 取出样品管, 反冲进样管 1 min, 再使用无菌水上样, 确保机器处于无菌环境且无次氯酸钠溶液残留。

**1.3.2 分选细胞可培养性的确定:** 确定 FSC 和 SSC 信号细胞分选区域后, 将该区域无荧光染色的大肠杆菌 K12 单细胞分选至含有 100  $\mu\text{L}$ /孔 LB 培养基的 96 孔板中, 其中 96 孔板的第 12 列(8 个孔)作为空白对照组只加入 100  $\mu\text{L}$ /孔 LB 培养基而无分选细胞。37 °C 培养 12 h, 记录生长情况。

**1.3.3 深海水体和沉积物样品的洗脱和分选:** 深海水体样品直接上样分选。深海沉积物样品微生物的洗脱: 将 5–10 g 样品加至 100 mL 灭菌人工海水中(3%, Sigma Aldrich), 16 °C 摇床振荡洗脱 8 h。静置待大颗粒自然沉降后取 10 mL 上层液体于 600 r/min 低速离心 10 min, 取 4 mL 上清液 4 °C

备用上样。清洗上样管线后, 根据利用参比菌株所确定的 FSC 和 SSC 信号细胞分选区域及分选程序, 将单细胞逐个分选至 96 孔板, 每孔含 100  $\mu$ L 改良的海洋 M13 培养基。96 孔板中, 第 1–11 列 (88 个孔) 作为实验组分选单细胞, 第 12 列 (8 个孔) 只加入 100  $\mu$ L/孔 LB 培养基作为空白对照组不分选细胞。分选后的单细胞置于 25  $^{\circ}$ C 培养。

#### 1.4 平板涂布法分离培养

取深海水体样品 100  $\mu$ L, 涂布于改良的海洋 M13 固体培养基上, 25  $^{\circ}$ C 培养。取沉积物样品 2–5 g, 人工海水悬浮, 16  $^{\circ}$ C 摇床振荡洗脱 8 h, 梯度稀释后取 100  $\mu$ L 涂布于改良的海洋 M13 固体培养基上, 25  $^{\circ}$ C 培养。待长出可辨认的菌落后, 挑选菌落于改良的 M13 固体培养基上, 平板划线法纯化。

#### 1.5 16S rRNA 基因 PCR 扩增、测序及序列比对

取 0.5 mL 纯菌液至 1.5 mL 离心管中, 煮沸 15 min 后液氮速冻, 重复 3 次。悬浮液 12000 r/min 离心 5 min, 取 1  $\mu$ L 上清液作为 DNA 模板; 以 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')<sup>[33]</sup> 为引物扩增 16S rRNA 基因; PCR 扩增程序为: 95  $^{\circ}$ C 10 min; 95  $^{\circ}$ C 45 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送北京擎科新业生物技术有限公司进行测序。将所获得的 16S rRNA 基因序列通过 Clustal 软件进行排序 (Alignment) 和相似性比对, 相似性低于 97% 作为不同的种, 即可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。取不同 OTU 代表性菌株的序列与 GenBank 数据库的核苷酸序列数据库通过 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) 进行序列比对分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 流式细胞分选区域的确定

为了区分海洋样品中颗粒物和菌体细胞, 提高分选效率, 首先通过参比菌株确定分选区域。除典型细菌大肠杆菌外, 还选用了细胞偏小且形状为不规则球状古菌硫化叶菌以及海洋常见的海杆菌和亚硫酸盐杆菌作为参比菌株。分别对荧光染色的大肠杆菌 K12、硫化叶菌 A20、海杆菌 IM-B4 和亚硫酸盐杆菌 DY297 进行流式单细胞分选, 结果显示细胞信号收集范围为 FSC 信号值  $10-10^5$  和 SSC 值  $10-10^4$ , 集中出现于 FSC 值  $10^2-10^3$  和 SSC 值  $10-10^3$  (图 1), 因此, 将流式细胞仪分选逻辑区域框选为 FSC 值  $10-10^5$  和 SSC 值  $10-10^4$ , 进行海洋样品细胞分选。

确定细胞分选区域后, 分选未标记大肠杆菌 K12 单细胞至含有 LB 培养基 (100  $\mu$ L/孔) 的 96 孔板中, 共分选 3 块 (88 个单细胞/块, 共 264 个单细胞)。37  $^{\circ}$ C 培养 12 h 后, 3 块板分别有 66 个、72 个、80 个培养孔出现混浊, 单细胞可培养率为 75%–90%。已证实流式细胞仪本身会对生物细胞具有一定的损伤, 如包裹微生物的液滴高速喷出, 造成对细胞的机械损伤, 偏转电极产生的电荷对细胞活性的影响, 以及液滴在高速撞击液体培养基表面导致的细胞破裂等<sup>[34–35]</sup>, 都会导致分选后的单细胞失活。我们对大肠杆菌的培养实验也证实了这一点, 但整体看大部分 (超过 75%) 的单细胞微生物经过流式分选后可以正常生长。周利艳等<sup>[36]</sup>采用流式细胞对隐球菌进行分析发现, *Cryptococcus neoformans* H99 经过流式细胞分选后可培养率为 80%–89%, 较高的可培养率表明, 流式细胞仪分选处理对细胞的损伤影响较

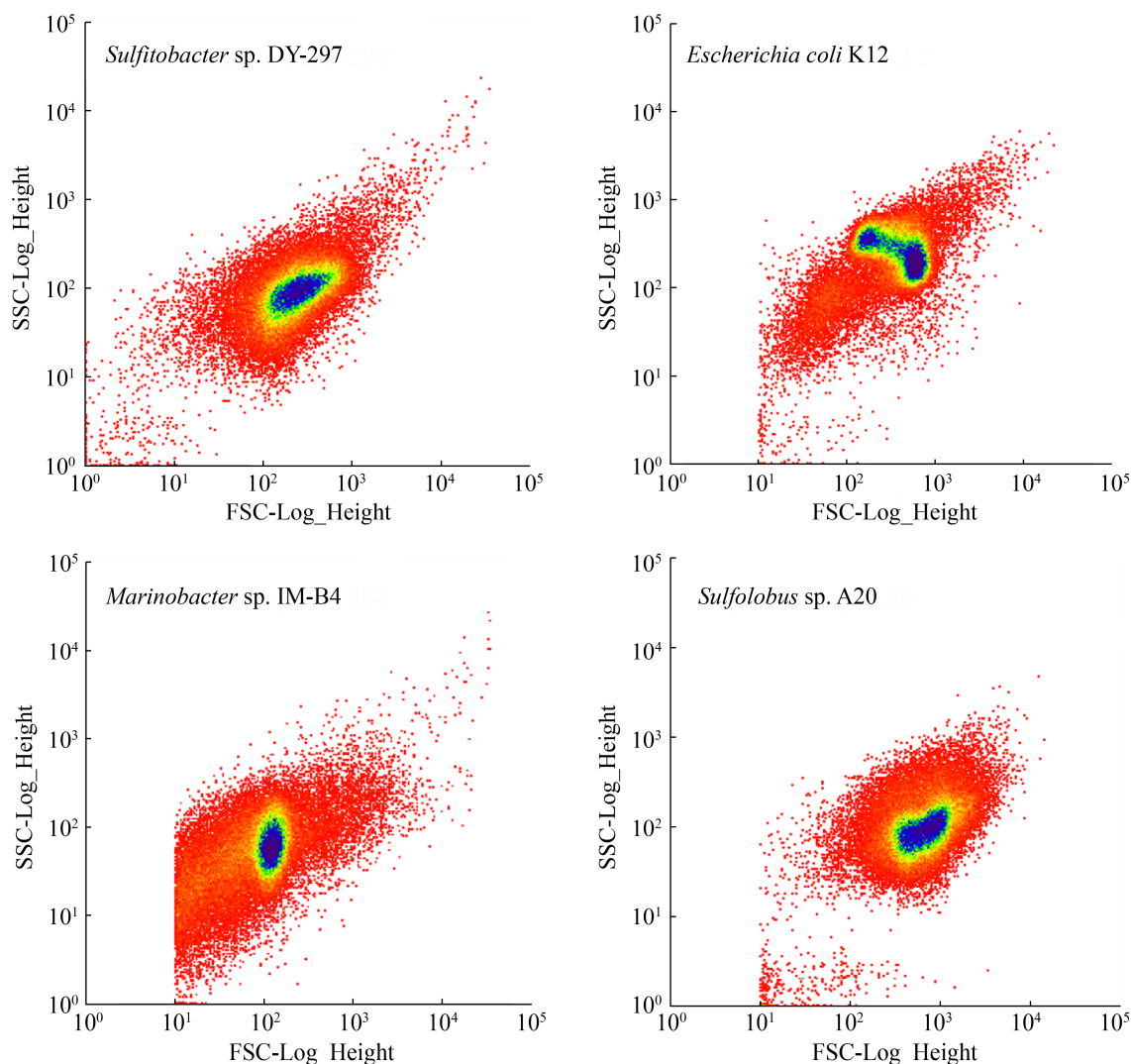


图 1. 参比菌株细胞分布区域

Figure 1. Dot plots obtained via cell sorting of the reference cells.

小。此外流式细胞分选所具有的通量高、分选准确等优势，一定程度上弥补了由于细胞损伤造成的影响。因此，利用流式细胞分选技术在该分选区域对环境样品微生物进行分离是可行的。

## 2.2 流式分选及高通量单细胞培养

### 2.2.1 深海微生物的单细胞培养效率：确定细胞分选区域后，将 2 个海水样品和 1 个沉积物洗脱样品进行流式细胞分选，3 个样品分别分选 3 块

96 孔板(每个 96 孔板分选 88 个单细胞)，共 792 个单细胞。792 个单细胞经过 60 d 培养，共产生了 232 个单细胞培养物，可培养率为 29.29%。其中海水样品 222 株，沉积物样品 10 株。两个海水样品中，96 孔板培养后孔内浑浊的发生率分别为 65.90%和 18.18%；沉积物样品中 96 孔板培养后孔内浑浊发生率仅为 3.79%。根据浑浊发生率，从沉积物洗脱样品获得单细胞培养比从水体样品更为困难。

**2.2.2 深海微生物单细胞培养菌株的多样性:** 以相似性大于 97%作为 OTU 界定阈值, 对通过单细胞培养获得的 232 株深海微生物菌株的 16S rRNA 基因进行扩增、测序和相似性分析, 发现它们分属于 27 个不同的 OTUs。从 2 个水样分别获得了 16 个 OTUs 和 10 个 OTUs, 而从沉积物样品仅获得 3 个 OTUs。将代表这些 OTUs 的菌株的 16S rRNA 基因序列与已发表的模式菌株 (type strain) 序列进行相似性比对, 结果显示, 与

232 株细菌 16S rRNA 基因最相似的微生物分属于 3 个门, 即变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)中的 27 个属, 相似性为 89.79%–100% (表 2)。其中, 从 2 个水体样品中获得的与 *Thalassospira* 属 (alpha-变形菌)和 *Alcanivorax* 属(gamma-变形菌)相似的菌株数最多, 分别为 53 株和 40 株, 相似性为 99.85%–100% (表 2, 图 2), 分离自沉积物的 10 株菌分别与 *Shimia*、*Sulfitobacter* 和

表 2. 通过单细胞分离及高通量培养获得的菌株 16S rRNA 基因序列相似性比对结果

Sample	Strain No.	The closest type strain (accession number)	No.	Length/bp	Identity/%
28II-S030-TVMC01	2ED5*	<i>Hyphobacterium vulgare</i> WM6 <sup>T</sup> (KR611720)	6	1422	95.37
	2CG4*	<i>Halovulum dunhuangense</i> YYQ-30 <sup>T</sup> (NR137232)	1	1420	94.94
	2QD8	<i>Rhodophyticola porphyridii</i> MA-7-27 <sup>T</sup> (KX268607)	1	1249	97.60
	2OG3	<i>Nocardioides salarii</i> CL-Z59 <sup>T</sup> (NR043786)	1	695	98.71
	2BA1	<i>Shimia abyssi</i> JAMH043 <sup>T</sup> (NR148628)	7	674	97.48
	2GB5	<i>Marinobacter alkaliphilus</i> ODP1200D-1.5 <sup>T</sup> (NR112223)	3	713	100.00
	2PG2	<i>Herminiimonas saxobidens</i> NS11 <sup>T</sup> (NR042610)	1	713	100.00
	2HD2	<i>Loktanella variabilis</i> J-MR2-Y <sup>T</sup> (NR134071)	7	674	100.00
	2TH1	<i>Maricaulis parjimensis</i> MCS 25 <sup>T</sup> (NR025323)	1	674	99.55
	20F1	<i>Thalassospira xiamenensis</i> M-5 <sup>T</sup> (CP004388)	1	674	100.00
	2RC10	<i>Erythrobacter nanhaiediminis</i> T30 <sup>T</sup> (NR116764)	1	674	100.00
	D107	<i>Thalassospira permensis</i> NBRC 106175 <sup>T</sup> (NR116841)	52	674	99.85
	D77	<i>Alcanivorax xenomutans</i> JC109 <sup>T</sup> (NR133958)	40	713	100
	D1	<i>Marinicaulis flavus</i> SY-3-19 <sup>T</sup> (KY861741)	6	1435	94.84
	D3	<i>Yonghaparkia alkaliphila</i> KSL-113 <sup>T</sup> (NR043675)	2	694	99.57
	D14	<i>Chelativorans intermedius</i> CC-MHSW-5 <sup>T</sup> (EU564843)	36	1476	92.75
	D6	<i>Wenzhouxiangella marina</i> Ma-11 <sup>T</sup> (NR136878)	8	1521	91.85
39V-IB-S007CTD02	3NB11	<i>Vicingus serpentipes</i> ANORD5 <sup>T</sup> (NR159281)	4	1489	89.79
	3KC3	<i>Hyphomonas pacifica</i> MCCC 1A04387 <sup>T</sup> (KF863109)	2	674	99.70
	3EH8	<i>Muricauda ruestringensis</i> DSM 13258 <sup>T</sup> (NR074562)	8	711	99.30
	3FD2	<i>Pelagibacterium halotolerans</i> B2 <sup>T</sup> (NR102924)	16	674	100.00
	3DG7	<i>Pseudooceanicola nanhaiensis</i> SS011B1-20 <sup>T</sup> (NR043797)	4	674	100.00
	3ED3	<i>Marteella mediterranea</i> DSM 17316 <sup>T</sup> (CP020330)	3	674	100.00
	3MD1	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 <sup>T</sup> (NR025145)	1	713	99.86
	3GG7	<i>Comamonas testosteroni</i> KS 0043 <sup>T</sup> (NR029161)	2	757	100.00
	CJ16	<i>Citricella marina</i> CK-I3-6 <sup>T</sup> (NR116507)	6	674	100.00
	CJ19	<i>Brevundimonas mediterranea</i> V4.BO.10 <sup>T</sup> (NR037108)	2	674	99.85
39IV-SWIR-S011TVG07	4AE3	<i>Shimia abyssi</i> JAMH043 <sup>T</sup> (NR148628)	3	674	97.48
	4BC11	<i>Sulfitobacter dubius</i> LMG20555 <sup>T</sup> (NR115917)	3	671	99.70
	4DH4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> NCTC10257 <sup>T</sup> (LT906480)	4	691	98.26

\*: published.

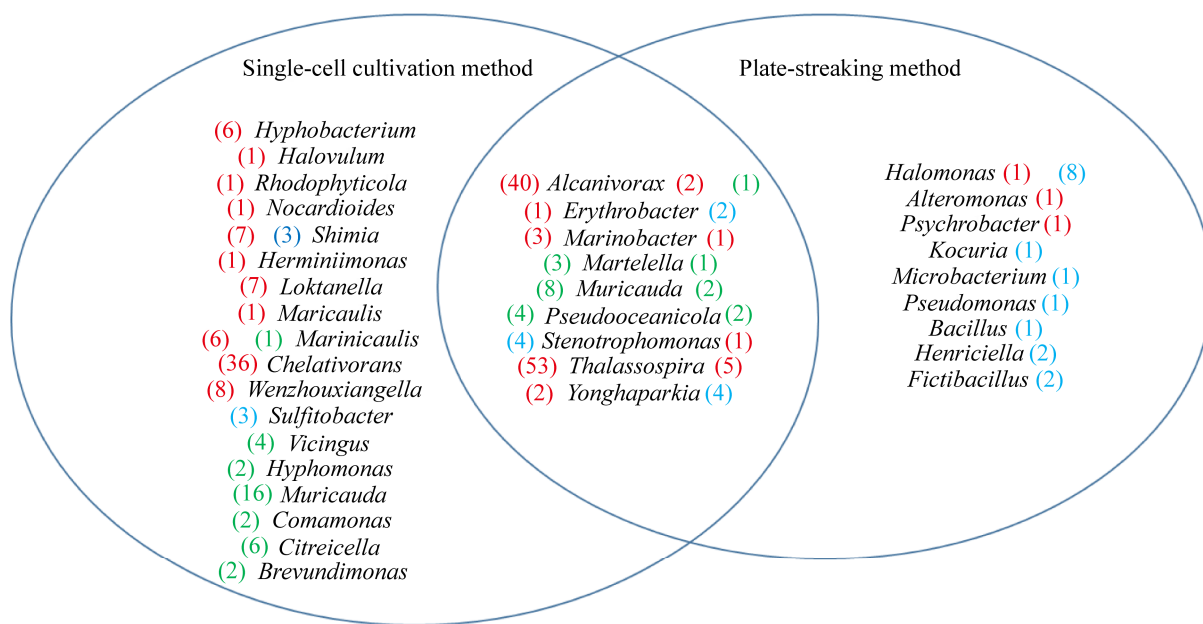


图 2. 流式分选高通量单细胞培养法与稀释平板法分离深海微生物效果之比较

Figure 2. Comparison between the high throughput single-cell cultivation method and the streaking plate method in the isolation of deep-sea microorganisms. The numbers of isolates are indicated in parentheses. Strains obtained by using the high-throughput single cell cultivation method and the plate culture method are shown to the left and the right of the genus name, respectively. Numbers of strains isolated from 28II-S030-TVMC01, 39IV-SWir-S011TVG07 and 39V-IB-S007CTD02 are shown in red, blue and green, respectively.

*Stenotrophomonas* 的 3 个属种相似，相似性为 97.48%–99.70%。

**2.2.3 通过单细胞培养获得的深海微生物新属种：**按照国际微生物分类标准，以 97%作为新分类单元指标，通过流式分选及高通量单细胞培养获得的菌株中，分属 6 个 OTUs 的 61 个菌株的 16S rRNA 基因序列与已知属种的模式菌株序列的相似性小于 97% (89.79%–95.37%)。这些菌株均来自水体样品，占分离株总数的 26.29% (表 3)。这 6 个 OTUs 分别以菌株 2ED5、2CG4、D1、D14、D6、3NB11 为代表。其中，菌株 2ED5 和菌株 2CG4 分别归属于变形菌门 alpha-变形菌纲红细菌目 (*Rhodobacterales*) 生丝单胞菌科 (*Hyphomonadaceae*) 的 *Hyphobacterium vulgare*

WM6<sup>T</sup> 和红杆菌科 (*Rhodobacteraceae*) 的 *Halovulum dunhuangense* YYQ-30<sup>T</sup>，相似性分别为 95.37% 和 94.94%。经进一步鉴定，这两个菌株分别确定为 *Hyphobacterium* 属和 *Halovulum* 属的新种，定名为 *Hyphobacterium indicum*<sup>[32]</sup> 和 *Halovulum marinum*<sup>[37]</sup>。

16S rRNA 基因序列的相似性分析显示，菌株 D1、D14、D6、3NB11 等与已知属种微生物的相似性均低于 94.5%，即 Yarza 等<sup>[38]</sup>提出的微生物分类中“属”的界定标准，为潜在的新属。菌株 D1 和菌株 D14 均与变形菌门 alpha-变形菌纲细菌相似，其中，菌株 D1 与短小盒菌目 (*Parvularculales*) 短小盒菌科 (*Parvularculaceae*) 的 *Hyphococcus flavus* SY-3-19<sup>T</sup> 相似性最高 (94.84%)；菌株 D14 与根瘤菌目 (*Rhizobiales*) 红菌

表 3. 平板分离培养菌株 16S rRNA 基因序列相似性比对结果

Sample	Strain No.	The closest type strain (accession number)	No.	Length/bp	Identity/%
28II-S030-TVMC01	C-28-1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423 <sup>T</sup> (MN240936)	1	634	99.53
	C-28-2	<i>Thalassospira indica</i> PB8BT <sup>T</sup> (CP031555)	5	674	100.00
	C-28-5	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15 <sup>T</sup> (NR074765)	1	713	100.00
	C-28-6	<i>Halomonas hamiltonii</i> W1025 <sup>T</sup> (NR115089)	1	707	99.86
	C-28-7	<i>Alteromonas australica</i> H 17 <sup>T</sup> (CP008849)	1	707	100.00
	C-28-8	<i>Psychrobacter pacificensis</i> NBRC 103191 <sup>T</sup> (NR114238)	1	713	99.44
	C-28-9	<i>Alcanivorax xenomutans</i> JC109 <sup>T</sup> (NR133958)	3	713	100.00
	C-39-4300-1	<i>Martellella mediterranea</i> DSM 17316 <sup>T</sup> (CP020330)	1	663	100.00
	C-39-4300-2	<i>Muricauda ruestringensis</i> DSM 13258 <sup>T</sup> (NR074562)	2	711	99.30
39V-IB-S007CTD02	C-39-4300-3	<i>Pseudoceanicola nanhaiensis</i> SS011B1-20 <sup>T</sup> (NR043797)	2	674	100.00
	C-39-4300-1	<i>Martellella mediterranea</i> DSM 17316 <sup>T</sup> (CP020330)	1	663	100.00
	C-39-4300-2	<i>Muricauda ruestringensis</i> DSM 13258 <sup>T</sup> (NR074562)	2	711	99.30
39IV-SWIR-S011TVG07	C-TVG07-1	<i>Kocuria assamensis</i> S9-65 <sup>T</sup> (KT989850)	1	697	100.00
	C-TVG07-2	<i>Microbacterium paraoxydans</i> CF36 <sup>T</sup> (MH281749)	1	696	100.00
	C-TVG07-3	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 <sup>T</sup> (KU041145)	1	713	98.60
	C-TVG07-4	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 <sup>T</sup> (MN176482)	1	724	100.00
	C-TVG07-5	<i>Henriciella pelagia</i> LA220 <sup>T</sup> (NR157792)	2	675	100.00
	C-TVG07-6	<i>Erythrobacter lutimaris</i> S-5 <sup>T</sup> (NR134028)	2	674	99.55
	C-TVG07-7	<i>Yonghaparkia alkaliphila</i> KSL-113 <sup>T</sup> (NR043675)	4	695	99.57
	C-TVG07-8	<i>Halomonas sulfidaeris</i> Esulfide1 <sup>T</sup> (NR027185)	8	707	99.58
	C-TVG07-9	<i>Fictibacillus halophilus</i> AS8 <sup>T</sup> (NR149289)	2	723	99.59

科 (*Rhodobiaceae*) 的 *Chelativorans intermedius* CC-MHSW-5<sup>T</sup> 相似性最高(92.75%); 菌株 D6 与变形菌门  $\gamma$ -变形菌纲着色菌目 (*Chromatiales*) 的 *Wenzhouxiangella marina* Ma-11<sup>T</sup> 相似性最高(91.85%); 而菌株 3NB11 与拟杆菌门黄杆菌纲 (*Flavobacteriia*) 黄杆菌目 (*Flavobacteriales*) *Cryomorphaceae* 科的 *Vicingus serpentipes* ANORD5<sup>T</sup> 相似性最高(89.79%)。分析新属种及其代表菌株的培养特性后发现, 它们均需要经过较长时间(基本均需超过一个月)才能够从单细胞形成培养物, 菌株从单细胞培养物转接时, 难以在平板上形成菌落, 这些菌株液体培养时的生长速率明显高于平板培养, 推测单细胞培养为这些菌株的生长提供了充分的空间和营养条件, 缓解了由于固体培养时生长缓慢带来的困难。

## 2.3 流式分选高通量单细胞培养法与稀释平板法的比较

在通过流式分选高通量单细胞培养的同时, 利用平板涂布法对 2 个海水和 1 个沉积物样品进行了常规的平板分离培养, 培养基及培养温度等培养条件与单细胞培养一致。挑取平板上形态、大小等有差异的菌落进行划线纯化, 共获得 40 株菌, 其中 18 株来自水体样品, 22 株来自沉积物样品。基于菌株 16S rRNA 基因相似性的分析表明, 40 株菌分属于 18 个不同的 OTUs, 水体样品获得 10 个 OTUs, 沉积物样品获得 9 个 OTUs。它们的代表菌株分别与变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 的 18 个属种的模式菌株相似, 16S rRNA 基因相似性为 98.6%–100% (表 3, 图 2), 因此, 采用传统平板分离方法, 没有获得新属种。

对两种方法获得菌株的 16S rRNA 基因进行相似性比对, 结果显示(图 2), 它们之间共有的 OTUs 共 9 个, 分属于 9 个属, 即 *Alcanivorax*、*Marinobacter*、*Thalassospira*、*Marteilella*、*Muricauda*、*Erythrobacter*、*Pseudooceanicola*、*Stenotrophomonas*、*Yonghaparkia*。具体看, 流式分选高通量单细胞培养法分离的海水样品微生物多样性较高; 相反, 稀释平板培养法从沉积物样品获得的微生物多样性明显高于单细胞培养。

### 3 讨论和结论

在本研究中, 通过流式分选高通量单细胞培养共获得 232 株菌, 其中, 绝大多数(222 株)菌株来自水体样品, 分离自沉积物样品的菌株较少且多样性不高。然而, 已有研究显示海洋沉积物中微生物的生物量和多样性远高于水体<sup>[39]</sup>。我们推测, 由于沉积物中孔隙较多, 对微生物的吸附以及矿物-微生物的结合使微生物难以从样品中洗脱分离, 导致分离培养的菌株数目较少。另外, 与海水相比较, 沉积物中存在比例更高、与细菌大小相似的胶体颗粒, 由于在实验中流式细胞仪基于光侧散射而非荧光分选逻辑, 胶体颗粒与未经染色处理的微生物细胞难以区分, 导致沉积物样品采用流式分选高通量单细胞培养方法所获得的新微生物菌株和类群少于水体样品。因此, 就沉积物样品中微生物的分离培养而言, 本文所采用的流式分选高通量单细胞培养方法没有优势。

海洋水体样品中微生物的含量一般为  $10^3$ – $10^5$ /mL, 即每微升样品含 1–100 个微生物细胞, 如果采用传统的平板涂布方法直接分离菌种, 一般平板上只能涂布 100–200  $\mu$ L 样品, 加上

培养基的选择作用, 只有少数适合培养条件且生长速度较快的属种得以形成菌落, 获得的微生物种类极为有限。采用流式细胞仪分选, 可以根据颗粒大小相对地富集水体中的微生物细胞, 随后的液体单细胞培养可为生长速率慢的微生物提供足够的空间和时间, 因此流式分选结合单细胞高通量培养能够有效地提高从原始样品中获得的微生物种类。我们的研究结果显示, 平板分离培养和流式分选高通量单细胞培养这两种方法所得到的微生物类群有较大的差异, 在采用两种方法得到的 36 个属中, 仅有 9 个属用两种方法分离得到。这就表明, 两种方法各有优势, 结合使用有助于分离获得更多的微生物。

流式分选高通量单细胞培养法在分离水体样品微生物时表现出明显优势。采用此法从水体样品分离获得的 222 株菌中, 61 株菌的 16S rRNA 基因序列与已知属种模式菌株的相似性低于 97%, 占总分离株的 26.29%, 它们是潜在的微生物新属种。在同样培养条件下, 高通量微生物单细胞培养方法可提高海水中微生物的可培养率, 获得更多微生物新属种。对分离获得的 6 个新属种的分析显示, 这些新属种生长较慢, 代时较长, 适于在液体培养基中生长, 而不易在平板上形成菌落, 这可能是这些菌株难以通过平板培养获得的原因。单细胞培养方法可以提供给菌株独立的生存空间、较长的生长时间、充分的养分以及较少的菌株间竞争; 此外, 本方法还具有培养通量大、无需后续纯化的优势, 因此, 有助于提高微生物培养的效率。

综上所述, 结合流式分选的非标记环境样品微生物单细胞分离培养有助于获取更多环境微生物新资源。

## 参考文献

- [1] Orcutt BN, Sylvan JB, Knab NJ, Edwards KJ. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, 75(2): 361–422.
- [2] Steen AD, Crits-Christoph A, Carini P, DeAngelis KM, Fierer N, Lloyd KG, Thrash JC. High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured. *The ISME Journal*, 2019, 13(12): 3126–3130.
- [3] Sunagawa S, Acinas SG, Bork P, Bowler C, Coordinators TO, Eveillard D, Gorsky G, Guidi L, Iudicone D, Karsenti E, Lombard F, Ogata H, Pesant S, Sullivan MB, Wincker P, de Vargas C. *Tara* oceans: towards global ocean ecosystems biology. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(8): 428–445.
- [4] Ping C, Zhang LM, Guo XX, Dai X, Liu L, Xi LJ, Wang J, Song L, Wang YZ, Zhu YX, Huang L, Huang Y. Diversity, biogeography, and biodegradation potential of actinobacteria in the deep-sea sediments along the Southwest Indian Ridge. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1340.
- [5] L'Haridon S, Markx GH, Ingham CJ, Paterson L, Duthoit F, Le Blay G. New approaches for bringing the uncultured into culture//Stal LJ, Cretoiu MS. *The Marine Microbiome: An Untapped Source of Biodiversity and Biotechnological Potential*. Cham: Springer, 2016: 401–434.
- [6] Button DK, Schut F, Quang P, Martin R, Robertson BR. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 881–891.
- [7] Connon SA, Giovannoni SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3878–3885.
- [8] Weaver JC, Bliss JG, Powell KT, Harrison GI, Williams GB. Rapid clonal growth measurements at the single-cell level: gel microdroplets and flow cytometry. *Bio/Technology*, 1991, 9(9): 873–877.
- [9] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 2002, 296(5570): 1127–1129.
- [10] Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, Pham L, Mehta A, Belanger A, Kanigan T, Lewis K, Epstein SS. Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of “Uncultivable” microbial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2445–2450.
- [11] Fierer N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(10): 579–590.
- [12] Zengler K. Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2009, 73(4): 712–729.
- [13] Ishøy T, Kvist T, Westermann P, Ahring BK. An improved method for single cell isolation of prokaryotes from meso-, thermo- and hyperthermophilic environments using micromanipulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(5): 510–514.
- [14] Hu BY, Xu BX, Yun JL, Wang J, Xie BL, Li CM, Yu YH, Lan Y, Zhu YX, Dai X, Huang Y, Huang L, Pan JZ, Du WB. High-throughput single-cell cultivation reveals the underexplored rare biosphere in deep-sea sediments along the Southwest Indian Ridge. *Lab on a Chip*, 2020, 20(2): 363–372.
- [15] Wang XX, Ren LH, Su YT, Ji YT, Liu YP, Li CY, Li XR, Zhang Y, Wang W, Hu Q, Han DX, Xu J, Ma B. Raman-activated droplet sorting (RADS) for label-free high-throughput screening of microalgal single-cells. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(22): 12569–12577.
- [16] Ferrari BC, Oregaard G, Sørensen SJ. Recovery of GFP-labeled bacteria for culturing and molecular analysis after cell sorting using a benchtop flow cytometer. *Microbial Ecology*, 2004, 48(2): 239–245.
- [17] Ishii S, Tago K, Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(5): 1281–1292.
- [18] Kennedy D, Wilkinson MG. Application of flow cytometry to the detection of pathogenic bacteria. *Current Issues in Molecular Biology*, 2017, 23: 21–38.
- [19] Bergquist PL, Hardiman EM, Ferrari BC, Winsley T. Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles*, 2009, 13(3): 389–401.
- [20] Liu WS, Kim HJ, Lucchetta E, Du WB, Ismagilov RF. 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 on a Chip*, 2009, 9(15): 2153–2162.
- [21] Manome A, Zhang H, Tani Y, Katsuragi T, Kurane R,

- Tsuchida T. Application of gel microdroplet and flow cytometry techniques to selective enrichment of non-growing bacterial cells. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 197(1): 29–33.
- [22] Zengler K, Toledo G, Rappé M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM, Keller M. Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(24): 15681–15686.
- [23] Huys GRB, Raes J. Go with the flow or solitary confinement: a look inside the single-cell toolbox for isolation of rare and uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 44: 1–8.
- [24] Abe T, Ushiki N, Fujitani H, Tsuneda S. A rapid collection of yet unknown ammonia oxidizers in pure culture from activated sludge. *Water Research*, 2017, 108: 169–178.
- [25] Fujitani H, Ushiki N, Tsuneda S, Aoi Y. Isolation of sublineage I *Nitrospira* by a novel cultivation strategy. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(10): 3030–3040.
- [26] Fujitani H, Kumagai A, Ushiki N, Momiuchi K, Tsuneda S. Selective isolation of ammonia-oxidizing bacteria from autotrophic nitrifying granules by applying cell-sorting and sub-culturing of microcolonies. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1159.
- [27] Irie K, Fujitani H, Tsuneda S. Physical enrichment of uncultured *Accumulibacter* and *Nitrospira* from activated sludge by unlabeled cell sorting technique. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 122(4): 475–481.
- [28] Bertani G. Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1951, 62(3): 293–300.
- [29] Dai X, Wang HN, Zhang ZF, Li K, Zhang XL, Mora-López M, Jiang CY, Liu C, Wang L, Zhu YX, Hernández-Ascencio W, Dong ZY, Huang L. Genome sequencing of *Sulfolobus* sp. A20 from Costa Rica and comparative analyses of the putative pathways of carbon, nitrogen, and sulfur metabolism in various *Sulfolobus* strains. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1902.
- [30] Zillig W, Kletzin A, Schleper C, Holz I, Janekovic D, Hain J, Lanzendörfer M, Kristjansson JK. Screening for *sulfolobales*, their plasmids and their viruses in Icelandic Solfataras. *Systematic and Applied Microbiology*, 1993, 16(4): 609–628.
- [31] Zobell CE. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *Journal of Marine Research*, 1941, 4: 42–75.
- [32] Ruan CJ, Zheng XW, Wang J, Song L, Zhu YX, Du WB, Lu ZJ, Huang Y, Huang L, Dai X. *Hyphobacterium indicum* sp. nov., isolated from deep seawater, and emended description of the genus *Hyphobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(12): 3760–3765.
- [33] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697–703.
- [34] Elliott S. Cell damage due to hydrodynamic stress in fluorescence activated cell sorters. The Ohio State University, 2009.
- [35] Rahmiani N, Bozorgmehr M, Torabi M, Akbari A, Zarnani AH. Cell separation: potentials and pitfalls. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2017, 47(1): 38–51.
- [36] Zhou LY, Fu Y. Using cell sorting techniques to explore the recovery of individual *Cryptococcus neoformans* cells. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(2): 326–333. (in Chinese)  
周利艳, 付钰. 一种制备新生隐球菌单细胞的方法. *微生物学报*, 2019, 59(2): 326–333.
- [37] Ruan CJ, Wang J, Zheng XW, Song L, Zhu YX, Huang Y, Lu ZJ, Du WB, Huang L, Dai X. *Halovulum marinum* sp. nov., isolated from deep-sea water of the Indian Ocean, and emended description of the genus *Halovulum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(8): 4523–4530.
- [38] Yarza P, Yilmaz P, Priesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(9): 635–645.
- [39] Wang Y, Sheng HF, He Y, Wu JY, Jiang YX, Tam NFY, Zhou HW. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8264–8271.

# Isolation of deep-sea microorganisms by flow cytometry-based high-throughput cell sorting and single cell cultivation

Chujin Ruan<sup>1,4</sup>, Xiaowei Zheng<sup>1</sup>, Li Wang<sup>1</sup>, Yi Wang<sup>1</sup>, Yaxin Zhu<sup>1</sup>, Jian Wang<sup>1</sup>, Juanli Yun<sup>1</sup>, Zhiyang Dong<sup>1</sup>, Zujun Lu<sup>4</sup>, Ying Huang<sup>1</sup>, Wenbin Du<sup>1,3</sup>, Li Huang<sup>1,2</sup>, Xin Dai<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup> College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

<sup>3</sup> Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

<sup>4</sup> College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541006, Guangxi Province, China

**Abstract:** [Objective] To test a single cell cultivation method involving flow cytometry-based high-throughput cell sorting and single cell cultivation in the isolation of microorganisms from deep-sea samples. [Methods] The flow cytometer sorted to microbial cells of interest based on the size and complexity of the particles using forward versus side scatter gating (SSC vs. FSC) without the need for fluorescence labeling. Then, the single cells were cultivated in 96-well plates and further transferred to agar plate for scale-up cultivation and taxonomic identification. The performance of this method to cultivate microorganisms from deep-sea water and sediment samples was evaluated. [Results] An optimal sort region was chosen to sort microbial cells from the deep-sea samples, following by high-throughput single-cell broth cultivation. A total of 61 potential novel microbial strains, which belong to 6 novel genus or species, were obtained from deep-sea samples from the Indian Ocean. The novel strains accounted for 26.29% of the total isolates and shared 89.79%–95.37% similarity at the 16S rRNA gene sequence level. [Conclusion] The FCM-based high-throughput cell sorting and single-cell cultivation method is more suitable for sorting and cultivating of sea-water microorganisms. This method may help increase the efficiency of identifying novel species from deep seas.

**Keywords:** microbial cultivation, single cell, flow cytometry, deep sea

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (91951105), by the China Ocean Mineral Resources R&D Association (DY135-B-02) and by the Senior User Project of RV KEXUE (KEXUE2019GZ05)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807418; E-mail: daixin@im.ac.cn

Received: 15 July 2020; Revised: 17 October 2020; Published online: 15 January 2021

**戴欣**, 中国科学院微生物研究所副研究员, 硕士生导师。长期从事深海、深部地下、热泉、瘤胃等极端环境微生物分子生态学研究。通过元基因组学、元转录组学和单细胞基因组学以及特殊分离培养技术解析极端环境微生物多样性及其互作, 发掘重要功能微生物菌种资源及基因资源。先后主持多个国家自然科学基金项目, 并作为骨干人员参加“国家重点基础研究发展计划”以及大洋“十一五”、“十二五”和“十三五”等课题研究。在 *Geobiology*、*Environmental Microbiology*、*Applied and Environmental Microbiology*、*Frontiers in Microbiology*、*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)* 等期刊发表论文 30 余篇。

