

海洋微生物高通量培养方法和分选技术的研究进展

袁东芳 于乐军 刘晨光*

(中国海洋大学 海洋生命学院 生物化学实验室 山东 青岛 266003)

摘要: 海洋环境中蕴含着丰富的微生物资源, 其在生态系统中发挥着重要作用, 与人类生活息息相关。但是迄今通过传统的培养方法可被培养分离的海洋微生物不到 1%。本文论述了海洋微生物的重要性, 大多数海洋微生物不可被培养的原因, 以及高通量培养方法和分选技术的研究进展。随着研究的深入, 将会有更加实用有效的高通量培养方法和分选技术出现。

关键词: 海洋微生物, 高通量培养, 分选技术

Progress in high-throughput culturing and sorting of marine microorganisms

YUAN Dong-Fang YU Le-Jun LIU Chen-Guang*

(Laboratory of Biochemistry, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong, 266003, China)

Abstract: Marine environments harbor a large variety of microorganisms that play an important role in the ecological system, most of them are closely related with human life. So far, only less than 1% marine microorganisms have been cultured by conventional methods. This paper discusses the importance of marine microbes, the reasons why most of marine microorganisms cannot be cultivated and progress in high-throughput culturing and sorting methods of marine microorganisms. With further research, more practical and effective high-throughput culturing and sorting methods will emerge.

Keywords: Marine microorganism, High-throughput culturing, Sorting methods

海洋是地球生命的摇篮, 包含地球上 80% 以上的生物资源, 其中含有种类丰富的微生物。2006 年美国、荷兰和西班牙科学家组成的一个研究小组揭示目前海洋微生物的种类大约有 10^7 种, 但实际上只有不到 1% 的海洋微生物能被培养和鉴定^[1-2]。

主要是由于传统培养方法存在一些局限性, 只有少部分的海洋微生物能够得到纯培养^[3], 表现在以下几个方面: (1) 实验室培养条件同自然条件的差异影响了海洋微生物的可培养性。许多微生物在自然环境中处于共生状态, 或受其他微生物及其代谢产

基金项目: 青岛市应用基础研究项目(No. 12-1-4-1-(3)-jch)

*通讯作者: Tel: 86-532-82832182; ✉: liucg@ouc.edu.cn

收稿日期: 2013-07-07; 接受日期: 2013-08-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

物的影响,海洋微生物在培养基上不能生长是由于离开了原来的共生环境,破坏了它们之间的共生关系以及一些必需生长信号的交流^[4-5]。例如一些海洋细菌处于活的非可培养状态^[6],为适应不良环境整个细菌细胞缩小成球形,在培养基上于常规条件下培养时,不能生长繁殖,需要提供特殊的培养条件方可获得培养。(2) 微生物之间的拮抗作用导致了一些海洋微生物生长受抑制。当微生物从自然环境进入人为环境时,一些环境适应性强的优势菌群快速生长,在此过程中产生大量过氧化物、超氧化物以及自由基等有害物质,这些物质能对细胞造成氧化胁迫从而使细胞受到损伤,因此使适应能力较差或生长缓慢的菌群受到抑制,难以在固体培养基中形成菌落^[4,7]。以上原因导致了大量的海洋微生物资源被埋没,极大地限制了海洋微生物的应用。因此,建立新型的海洋微生物培养方法和分选技术,培养筛选出大量以往不可培养的海洋微生物物种具有重要的意义。本文对近年来海洋微生物高通量培养方法和分选技术的研究进展进行了综述。

1 海洋微生物高通量培养技术

为培养出更多的海洋微生物物种,近年来研究者们进行了很多尝试,例如培养基的改进、目标微生物的特殊富集、模拟自然环境条件、原位培养、单个细胞的分离培养等^[8-11]。与此同时,一些新的培养方法和培养装置不断地被开发出来,这些新型的培养方法遵循一个基本原理——模拟目标群体的自然生存环境。其中,改进的高通量培养技术最有发展前景,该技术在一定程度上模拟了自然环境,使所有的微生物处在一个开放的、连续的培养环境中,不破坏微生物之间的生态联系,但同时又将单个微生物分离培养,避免了混合培养时的营养竞争问题,使微生物能够获得纯培养,该技术具有多个培养单元,操作简单,可以在短期内检测大量的培养物,并且可以培养出更多新物种,提高了工作效率,从而实现微生物的高通量培养,该技术已成功分离培养了海洋和土壤中的微生物^[12]。微

生物高通量培养分离技术的建立,有望培养出大量以往未被培养出的微生物,这将对天然活性物质的筛选以及生态学的研究具有重要的意义。

1.1 基于培养板的高通量培养法

2002年Connon等^[13]在Button等^[14]的稀释培养法(Dilution culturing)基础上提出高通量培养法(High-throughput culturing, HTC),该方法将样品稀释至痕量后,采用小体积48孔细胞培养板分离培养微生物。Cho等^[15]利用该方法从太平洋近海和远洋海水中分离出多种新菌。在此基础上,Rappé和Connon结合荧光原位杂交技术,对高通量培养法进行了改进,根据从培养板各孔中针对性地检测SAR11进化分支的海洋细菌的存在,在较短时间内对目标微生物进行了大量的培养^[13,16]。

基于培养板的高通量培养法有效地提高了微生物的可培养性,并且可以在短期内检测大量的培养物,大大提高了工作效率。但是也存在一定的局限性,即在样品稀释,降低微生物间不利作用的同时,有利作用也被削弱。例如,当微生物被极度稀释、初始接种量很小时,微生物分泌的代谢产物也被稀释,其他共生微生物由于缺乏这些必需的代谢产物,生长就会受到抑制;再者,缺少种间的共生关系和群体效应,很多微生物仍然不可培养^[7,17-20]。

1.2 微包埋培养技术

微包埋技术是指利用天然或合成高分子材料通过化学法、物理法或物理化学法将另一种物质包裹起来,形成一种具有半透性或密封囊膜的微型胶囊的技术^[12]。微包埋技术已经用在动植物细胞包埋、微生物包埋、固定化酶及药物缓释(医药)等诸多领域,为我们提供了一个认识和开发海洋微生物资源的新途径。

Weaver等^[21]最早使用微包埋技术通过油水乳化法包埋培养微生物和动物细胞,1996年Gift等^[22]用凝胶微球来分离慢性生长的酵母,2000年Katsuragi等^[23]展示了包埋的酵母可以依赖自荧光性得以分选,2005年Akselband等^[7]利用微包埋技术从混合样品中培养分选出生长缓慢的海洋微生

物。在此基础上,我们实验室研究总结了多种微球制备方法^[24],并且对微包埋培养技术进行了改进,设计了微生物的高效培养分选方法和培养装置,基本流程如图1所示。通过该方法培养了海洋哈维氏弧菌,并分析了极地底泥样品和青岛文昌鱼繁殖区海水及沉积物样品的微生物多样性,获得了6株潜在海洋细菌新种,经鉴定均属于副球菌属。

微包埋培养技术与传统培养方法相比有以下优点:(1)微球可以与外界环境进行物质交换,使包埋的微生物处于开放的连续补充营养的体系中,从而可以保证培养环境接近于微生物的自然生存环境;(2)微球包埋基本实现一个微球包一个微生物细胞,从而避免混合培养时微生物之间的竞争;(3)聚合物材料所形成的物理屏障可以对微生物细胞起到保护作用,增强微生物细胞的代谢活性,提高代谢物的产率^[25],例如增强微生物细胞对不良环境的耐受性^[26]等;(4)微球易于操作,微包埋可以增强微生物细胞的可操控性,实现对微生物的宏观操作(如FACS)。

微包埋培养技术能够有效培养海洋微生物的

同时仍有不足之处:(1)目前使用较多的琼脂糖凝固点较低,在操作过程中需要加热,会对一些微生物造成危害;琼脂糖微球的机械强度不高,随着培养时间的延长,微球容易破碎影响分选结果。

(2)常用的油水乳化法制备的微球粒径均一性较差,在一定程度上影响包埋微生物的生长和分选。

1.3 扩散盒高通量培养技术

扩散盒由一个环状的不锈钢垫圈和两侧胶连的孔径为0.03 μm滤膜组成,滤膜只能有效地让培养环境中的化学物质通过而不断地让微生物细胞通过,培养时,使天然海水循环流动(图2)^[27]。Kaeberlein T.和Nichols D.观察发现,一些环境中不可培养的微生物通过在扩散盒中反复培养后可以在培养基中生长,由此推断在扩散盒中的孵化可以提高可培养的微生物物种的多样性^[27]。该研究组使用扩散盒分离培养潮间带底泥中的微生物,培养1周后培养基上产生大量的微型菌落,数目高达接种微生物的40%^[28]。后来根据所要培养的菌种的特点,2005年Ferrari等^[29]对此种扩散盒进行改进,发明了用来培养土壤微生物的基质膜法。

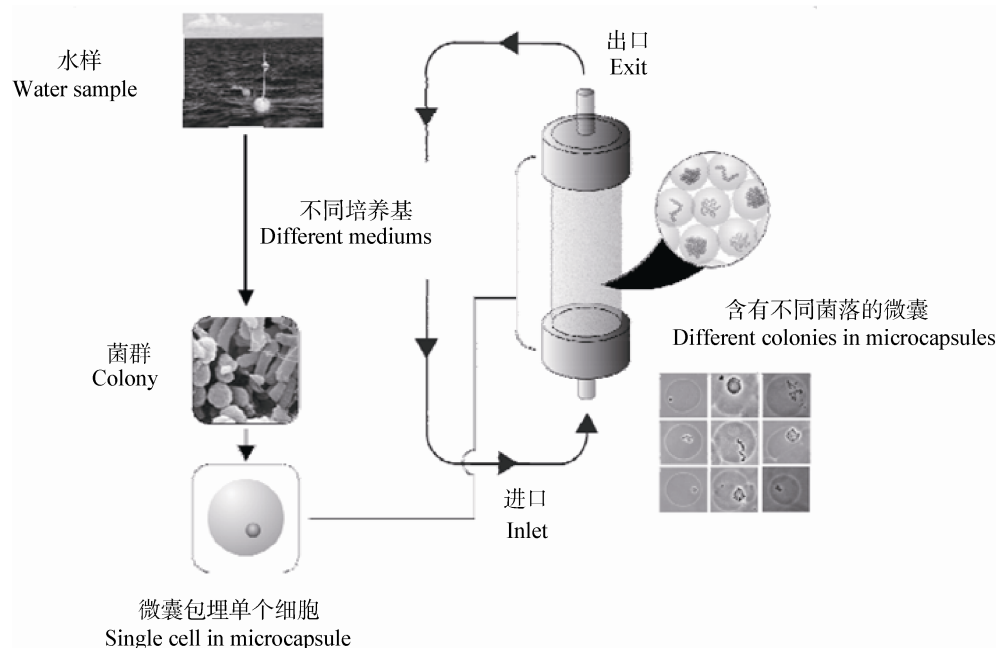


图1 微包埋技术培养海洋微生物的流程图

Figure 1 Flow diagram of culturing marine organisms by using microencapsulation technology

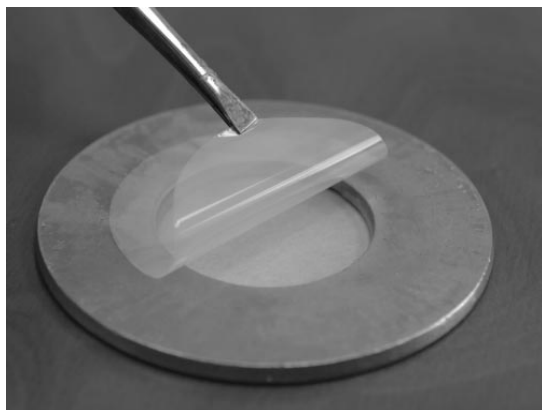


图2 原位培养微生物的扩散盒^[27]

Figure 2 General view of the diffusion chamber for *in situ* microbial cultivation^[27]

扩散盒高通量培养微生物具有以下优势:(1) 扩散盒本身对微生物细胞无毒性;(2) 扩散盒也可以为微生物提供生长所需要的成分,包括营养物质、信号分子,还可以移除代谢产物,维持微生物群落间的作用,获得微生物的多样性明显高于培养基培养获得的^[27]。但是该培养方法仍然存在一定的缺陷,即扩散盒法操作比较繁琐,费时费力,并且该方法不能使微生物的高通量培养和物种分选同时进行^[30]。

1.4 中空纤维膜装置高通量培养技术

中空纤维膜装置是由中空纤维膜——聚偏二氟乙烯膜(膜的透过率为67%–70%,膜小孔的孔径为0.1 μm)形成一个小室,每个装置系统包括48–96个这样的小室单元(小室内径为0.76 mm,外径为1.2 mm);该装置的上部为注射器构成的注射进样口,在培养过程中下部浸在液相中,上部覆盖一个罩子保持无菌状态(图3)。将从环境中抽取的微生物样品稀释后注入小室,该装置可以提供原位环境,继而培养微生物^[31]。

中空纤维膜装置培养微生物有以下几个特点:

(1) 多孔膜允许化合物的交换(营养物质、信号分子等),但是阻止微生物细胞进出,从而保持稳定的生长条件(例如,抑制微生物生长活性的代谢产物和分泌物可以快速透过膜),允许微生物生长所

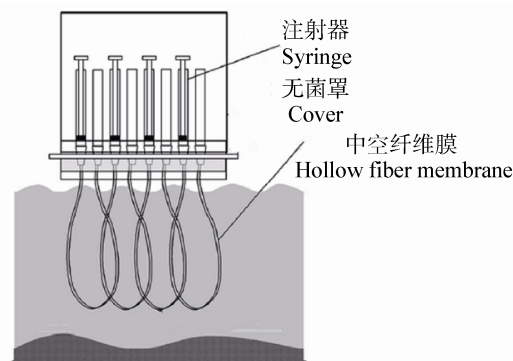


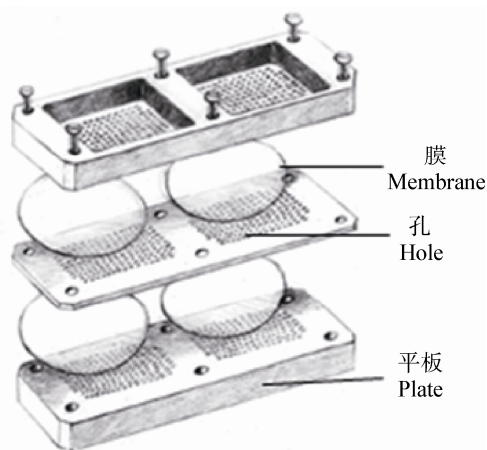
图3 在环境条件下利用 HFMC 培养环境微生物的示意图^[31]

Figure 3 The schematic diagram of culturing microorganisms under the condition of environment by using HFMC^[31]

必需的种间和种内的相互作用,因而微生物可以在模拟外界环境的条件下生长;(2) 该装置系统可以摄取不同类型的底物,例如连续加入低浓度的底物有利于微生物的生长(有时高浓度的底物对微生物是有毒的)^[32–33]。但是该方法培养微生物时必须依赖于稀释,因此在一个装置中只有小量的分离群体可以获得培养;并且该装置需要进一步的技术改善,结合细胞分选系统——流式细胞仪分选获得单个微生物细胞,使每个小室单元中孵化培养一个微生物细胞效果会更好^[31]。

1.5 分离芯片高通量培养技术

分离芯片是由包含有很多小孔的平板构成,这种平板由疏水性的可塑的聚甲醛制作而成,上下两块板通过螺丝钉钉在一起,形成直径为1 mm的多个小孔,整块板分为两个区域,每个区域有192个孔,用直径为25–47 mm的膜覆盖(图4)。在培养开始之前,将灭菌的中央板浸泡在微生物细胞悬浮液中,使每个小孔获得一定数量的微生物细胞,微生物细胞的数量取决于稀释的程度,当微生物细胞悬浮在液态琼脂中,微生物细胞进入小的琼脂球中凝固,被每个小孔分别获取,从而与其他微生物细胞分离开来。然后用膜将板上的每一个区域覆盖,最后将上下两块板钉好,形成多个密封的分散小室,在微生物原来的生存环境下进行原位培养^[32]。

图4 分离芯片示意图^[32]Figure 4 The schematic diagram of isolation chip^[32]

分离芯片高通量培养分选微生物有以下几个优点：(1) 该装置形成的小室是密封的，不允许微生物细胞进出，通过物质扩散获得原位环境，适于微生物生长，形成菌落的微生物细胞数量明显高于传统培养方法，易于观察，获得的微生物多样性明显高于传统培养方法；(2) 培养同样的样品，该方法获得的代表物种与传统方法获得的代表物种明显不同；(3) 该方法操作简单，取样容易，每个人一天可以建立 10–20 个分离芯片，孵化培养时不需要做任何工作，并且该方法能够一步完成微生物的生长和分选^[32]。但是该方法培养分选的效果同样依赖于样品的稀释程度^[32]；并且制作平板和膜的材料要求严格，不能危害微生物细胞的生存。

2 微生物高通量筛选(分选)技术

综上所述，高通量培养方法由很多培养单元组成，当培养结束时产生了大量需要分析处理的样品，而传统的微生物筛选和鉴定方法已不能满足这方面的需要。为解决这类问题，近年来发展了一些高通量筛选和分析技术。其中已经成功应用的主要有微流体技术和流式细胞技术。

2.1 微流体技术

微流体技术是在微观尺度下控制、操作和检测复杂流体的技术。微流体装置被用来分离单个细胞和分选目标细胞，近年来该技术已经用来高通量分

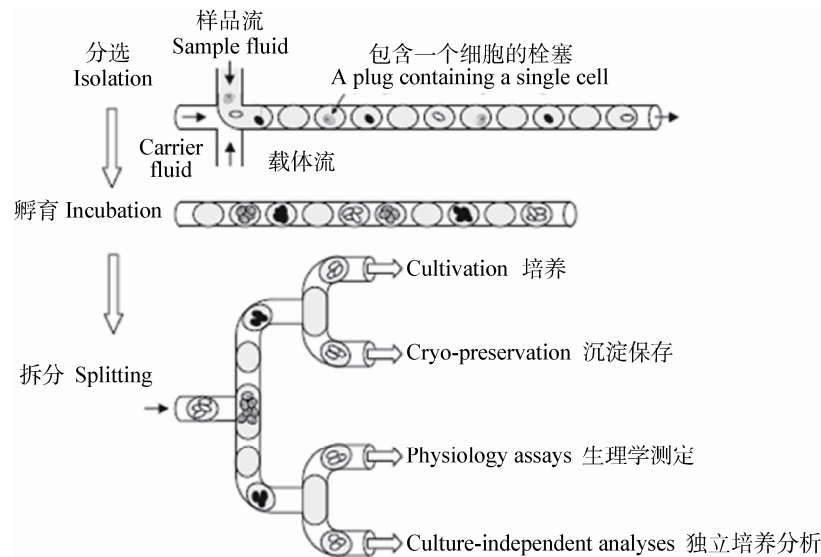
选微生物。

1999 年 Fu 等^[34]设计了一种微流体装置—— μ FACS 用来分选包括大肠杆菌细胞在内的各种微粒。2005 年 Hu 等^[35–36]对这一技术进行改进，发明了一种微流体细胞分选器，利用双向电泳从背景群体中分离目标细胞。在双向电泳辅助的细胞分选器中，被抗体标记的目标细胞与聚苯乙烯珠结合，然后被标记的细胞从电极跑出，在流动过程中被收集，这个系统可以以 $>10^4$ cells/s 的速度高通量的分选细胞，当该系统中的聚苯乙烯珠被磁性微珠取代后，磁性微珠与标记的细胞结合，磁场可以用来偏转和分选细胞(磁性辅助性细胞分选)^[37]。在此基础上，Moon 等^[38]发明了一个类似的装置分离空气中传播的微生物和粉尘颗粒。另外，2009 年 Kose 等^[39]发明了一个微流体装置用来分选细胞。这个装置利用一种包含磁性纳米粒(铁磁流体)的传递液，当电流产生一个外磁场时，磁性纳米粒被吸引移动到电极，结果是非磁性的微粒(细胞)远离电极聚集在一个特定位置，临界电流频率依据微粒大小引起非磁性微粒的移动，因此可以依赖微粒大小对细胞进行分选。

以上装置是对已培养的细胞进行分选，2009 年 Liu 等^[40]发明了一个有潜力的装置——基于小栓塞的微流体方法，该微流体装置可以使微生物培养和分选同时进行。该方法允许单个微生物细胞的分选，孵化和克隆体系的分离，用于更深层的研究。在这个装置中，来自于混合群体的单个微生物细胞被随机的分到不同的栓塞中，这些栓塞被孵化形成单个微生物细胞的微菌落，克隆体系被分成亚种群，用于进一步的分析培养、低温贮藏、生理学实验和独立性培养分析(图 5)。

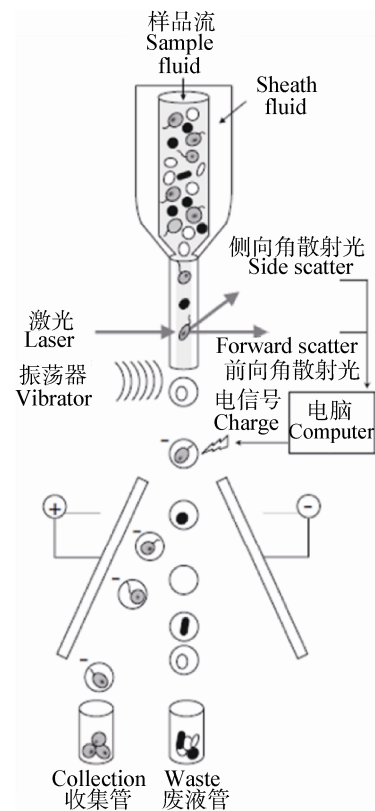
2.2 流式细胞术和细胞分选

流式细胞术是从细胞群中定量分析成千上万的单个细胞或悬浮颗粒的多个特征的一种方法^[41]。当经荧光染色或标记的单细胞悬液放入样品管中，被高压压入流动室内。流动室内充满鞘液，在鞘液的包裹和推动下，细胞被排成单列，以一定

图5 基于栓塞包埋单个细胞的微流体分选系统的示意图^[40]Figure 5 The schematic diagram of microfluidic screening system based on thrombosis of embedding a single cell^[40]

速度从流动室喷嘴喷出,在与细胞液流成 90° 方向上,激光束照射液流,使细胞产生散射光和荧光。通过光学系统检测并接收这些光学信号,同时转换成电脉冲信号。电脉冲信号经过计算机处理,得出每个细胞的多种信息参数^[31,42-43]。

流式细胞术在微生物学和生物技术领域的最广泛应用就是细胞分选^[31]。液滴的偏转被用来高通量的分选微生物细胞,由光束强烈的振动使液流产生的每一个液滴包含一个微生物细胞,包含目标微生物的液滴被偏转到一个收集管或微量滴定板中(图6)。流式细胞术可以以 $>10^4$ cells/s 的速度对单个微生物细胞进行高通量的分析和分选。例如单细胞包埋技术在水油水乳液中包埋单个的 *E. coli* 转化子随后用流式细胞仪可以分选 $>10^7$ 个突变体^[44]。流式细胞仪还可以利用荧光抗体对感兴趣的微生物进行快速定量的分选^[45-46]。例如,1993年 Porter 等^[47]利用荧光抗体和流式细胞仪富集了来自自然湖水和污泥样品中的 *E. coli* 细胞。2002年 Zengler 等^[48]用凝胶微球包埋来自于自然环境中的单个细胞,然后在模拟环境条件下培养获得微菌落,这些包含微菌落的微胶囊通过流式细胞术与自由生长的微生物和空微球分开,被转移到 96 孔板

图6 流式细胞仪和细胞分选的示意图^[35]Figure 6 Schematic diagram of flow cytometry and cell sorting^[35]

上进一步培养。通过这种方法,监测这些微胶囊中单个细菌的特征有利于分选微生物新种。

3 总结

随着现代社会的发展需求,人们将眼光聚焦到开发海洋资源,而其中丰富的海洋微生物资源对于整个海洋生态系统的作用极为重要,例如海洋当中有多种可以降解海洋石油、防治赤潮生物、拮抗引起海洋水产动物疾病病原菌的微生物物种等。但是基于传统的培养方法可以培养的海洋微生物种类屈指可数,现在的培养和分选技术对于充分开发利用海洋微生物资源还远远不够。因此,需要不断提高改善已有技术,发明新的培养分选技术,不断培养分选出新的微生物物种为人类所利用。

参 考 文 献

- [1] Kogure K, Simidu U, Taga NA. Tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1979, 25(3): 415-420.
- [2] 焦瑞身. 新世纪微生物学者的一项重要任务——未培养微生物的分离培养[J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 641-645.
- [3] Rappe MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority[J]. Annual Review of Microbiology, 2003, 57: 369-394.
- [4] Bruns A, Heribert C. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacterial from the central Baltic sea[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3978-3987.
- [5] Guan LL, Onuli HI. Bacterial growth stimulation with exogenous siderophore and synthetic N-acyl homoserine lacton autinducers under iron-limited and low-nutrient conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 2797-2803.
- [6] XU HS. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment[J]. Microbial Ecology, 1982, 8(4): 313-323.
- [7] Akselband Y, Cabral C, Castor TP, et al. Enrichment of slow-growing marine microorganisms from mixed cultures using gel microdrop (GMD) growth assay and fluorescence-activated cell sorting[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2006, 329(2): 196-205.
- [8] Karine AJQ. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges[J]. Extremophiles, 2009, 13(4): 583-594.
- [9] Kikuchi Y. Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability[J]. Microbes and Environments, 2009, 24(3): 195-204.
- [10] Yamada T, Sekiguchi Y. Cultivation of uncultured Chloroflexi subphyla: significance and ecophysiology of formerly uncultured Chloroflexi 'Subphylum I' with natural and biotechnological relevance[J]. Microbes and Environments, 2009, 24(3): 205-216.
- [11] Zengler K. Central role of the cell in microbial ecology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2009, 73(4): 712-729.
- [12] Simon B. Microencapsulation: Methods and Industrial Applications[M]. New York: CRC Press, 2005.
- [13] Connon SA, Giovannoni SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3878-3885.
- [14] Button DK, Schut F, Quang P, et al. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedure, and initial results[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 881-891.
- [15] Cho JC, Giovannoni SJ. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 432-440.
- [16] Morris RM, Rappé MS, Connon SA, et al. SAR11 clade dominates ocean surface bacterio-plankton communities[J]. Nature, 2002, 420: 806-810.
- [17] Bruns A, Nubel U, Cypionka H, et al. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of fresh water bacterioplankton[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 1980-1989.
- [18] Bussmann I, Philipp B, Schink B. Factors influencing the cultivability of lake water bacterial[J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 47(1): 41-50.
- [19] Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, et al. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4748-4755.
- [20] Zengler K, Toledo G, Rappé M, et al. Cultivating the uncultured[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(24): 15681-15686.
- [21] Weaver JC, Bliss JG, Powell KY, et al. Rapid clonal growth measurements at the single cell level: gel microdrops and flow cytometry[J]. Biotechnology, 1991, 9(9): 873-876.
- [22] Gift EA, Park HJ, Paradis GA, et al. FACS-based isolation of slowly growing cells: double encapsulation of yeast in gel microdrops[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14(7): 884-887.
- [23] Katsuragi T, Tanaka S, Nagahiro S, et al. Gel microdroplet technique leaving microorganisms alive for sorting by flow cytometry[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 42(1): 81-86.
- [24] 冀世奇, 刘晨光, 张晓华. 海洋微生物微包埋培养及应用研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(4): 53-59.
- [25] Qi WT, Ma J, Yu WT, et al. Behavior of microbial growth and metabolism in alginate chitosan alginate (ACA) microcapsules[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006,

- 38(5): 697-704.
- [26] Sun ZJ, Lv GJ, Li SY, et al. Probing the role of microenvironment for microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 128(1): 150-161.
- [27] Bollmann A, Lewis K, Epstein SS. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(20): 6386-6390.
- [28] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1127-1129.
- [29] Ferrari BC, Binnerup SJ, Gillings M. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil Bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(12): 8714-8720.
- [30] Link AJ, Jeong KJ, Georgiou G. Beyond toothpicks: new methods for isolating mutant bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(9): 680-688.
- [31] Aoi Y, Kinoshita T, Hata T, et al. Hollow-Fiber membrane chamber as a device for in situ environmental cultivation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3826-3833.
- [32] Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, et al. Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable" microbial species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2445-2450.
- [33] Ishii S, Tago K, Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(5): 1281-1292.
- [34] Fu AY, Spence C, Scherer A, et al. A microfabricated fluorescence-activated cell sorter[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(11): 1109-1111.
- [35] Bessette PH, Hu X, Soh HT, et al. Microfluidic library screening for mapping antibody epitopes[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(5): 2174-2178.
- [36] Hu X, Bessette PH, Qian J, et al. Marker-specific sorting of rare cells using dielectrophoresis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005(102): 15757-15761.
- [37] Adams JD, Kim U, Soh HT. Multitarget magnetic activated cell sorter[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(47): 18165-18170.
- [38] Moon HS, Nam YW, Park JC, et al. Dielectrophoretic separation of airborne microbes and dust particles using a microfluidic channel for real-time bioaerosol monitoring[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(15): 5857-5863.
- [39] Kose AR, Fischer B, Mao L, et al. Label-free cellular manipulation and sorting via biocompatible ferrofluids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(51): 21478-21483.
- [40] Liu W, Kim HJ, Lucchetta EM, et al. 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[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(15): 2153-2162.
- [41] Brehm-Stecher BF, Johnson EA. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(3): 538-559.
- [42] Czechowska K, Johnson DR, Meer JRVD. Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology[J]. *Current Opinion in Microbiol*, 2008, 11(3): 205-212.
- [43] Davey HM, Kell DB. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1996, 60(4): 641-696.
- [44] Aharoni A, Amitai G, Bernath K, et al. High-throughput screening of enzyme libraries: thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2005, 12(12): 1281-1289.
- [45] Li D, He M, Jiang SC. Detection of infectious adenoviruses in environmental waters by fluorescence-activated cell sorting assay[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(5): 1442-1448.
- [46] Veal DA, Deere D, Ferrari B, et al. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells[J]. *Immunological Methods*, 2000, 243(1/2): 191-210.
- [47] Porter J, Edwards C, Morgan JA, et al. Rapid, automated separation of specific bacteria from lake water and sewage by flow cytometry and cell sorting[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(10): 3327-3333.
- [48] Bergquist PL, Hardiman EM, Ferrari BC, et al. Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology[J]. *Extremophiles*, 2009, 13(3): 389-401.