



# 单细胞水平解析土壤固氮鱼腥藻的碳氮固存过程研究进展

陈同<sup>1,2#</sup>, 赵远<sup>1#</sup>, 彭成荣<sup>3</sup>, 荆晓艳<sup>4</sup>, 梁玉婷<sup>2\*</sup>

- 1 常州大学环境科学与工程学院, 江苏 常州 213164
- 2 中国科学院南京土壤研究所 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008
- 3 中国科学院水生生物研究所 藻类生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430072
- 4 中国科学院青岛生物能源与过程研究所单细胞中心, 山东 青岛 266101

陈同, 赵远, 彭成荣, 荆晓艳, 梁玉婷. 单细胞水平解析土壤固氮鱼腥藻的碳氮固存过程研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 1721-1734.

CHEN Tong, ZHAO Yuan, PENG Chengrong, JING Xiaoyan, LIANG Yuting. Research progress in the mechanisms of carbon and nitrogen sequestration by *Anabaena azotica* in soil at the single-cell level[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 1721-1734.

**摘要:** 固氮鱼腥藻作为光能自养型微生物, 具备良好的碳氮固存能力。施加固氮鱼腥藻能够提升土壤肥力并减少化肥施用量。然而, 解析固氮鱼腥藻在土壤中的碳氮固存机制以及不同菌株固存效率差异仍有待深入研究。因此, 从单细胞水平对土壤固氮鱼腥藻菌株进行筛选和碳氮固存过程的研究至关重要。针对固氮鱼腥藻在单细胞水平上发生的复杂而动态的元素变化过程, 本研究综述了土壤固氮鱼腥藻碳氮固存过程, 并探讨了利用纳米二次离子质谱法与稳定同位素标记结合(nano-secondary ion mass spectrometry-stable isotopic probing, NanoSIMS-SIP)技术和拉曼光谱成像与稳定同位素标记结合(Raman spectroscopy imaging-stable isotopic probing, Raman-SIP)技术解析单细胞水平上的碳氮元素的时空分布的原理、进展与难点。重点关注了单细胞稳定同位素技术定量可视化固氮鱼腥藻碳氮固存的最新技术发展与应用。同时, 对该类可视化技术的未来研究进行了展望。本研究对于理解固氮鱼腥藻在土壤中的碳氮固存机制和固氮效率差异具有重要的科学意义, 为农业生产中减少化肥使用、提高土壤肥力提供理论依据。

**关键词:** 单细胞; 固氮鱼腥藻; 纳米二次离子质谱; 拉曼光谱; 稳定同位素探针

资助项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA28030102)

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA28030102).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. Tel: +86-25-86881568, E-mail: ytliang@issas.ac.cn

Received: 2023-10-09; Accepted: 2023-12-13; Published online: 2023-12-29

# Research progress in the mechanisms of carbon and nitrogen sequestration by *Anabaena azotica* in soil at the single-cell level

CHEN Tong<sup>1,2#</sup>, ZHAO Yuan<sup>1#</sup>, PENG Chengrong<sup>3</sup>, JING Xiaoyan<sup>4</sup>, LIANG Yuting<sup>2\*</sup>

1 School of Environmental Science and Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, Jiangsu, China

3 State Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China

4 Single-Cell Center, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

**Abstract:** *Anabaena azotica*, as a photoautotrophic microorganism, has good carbon and nitrogen sequestration abilities. The application of *A. azotica* could improve soil fertility and reduce the application of chemical fertilizers. However, the mechanism of carbon and nitrogen sequestration in soil by *A. azotica* and the sequestration efficiency of different strains remain to be studied. Therefore, it is important to screen *A. azotica* strains and probe into the processes of C and N sequestration in soil by the strains at the single-cell level. In view of the complex and dynamic process of element changes in *A. azotica* at the single-cell level, this study introduced the carbon and nitrogen sequestration process in soil by *A. azotica*. In addition, we expounded the principle, progress, and difficulties of using nano-secondary ion mass spectrometry combined with stable isotopic probing (NanoSIMS-SIP) and Raman spectroscopy imaging combined with stable isotopic probing (Raman-SIP) to analyze the spatiotemporal distribution of carbon and nitrogen at the single-cell level. This review focuses on the latest technological development and application of single-cell stable isotope technology for quantitative visualization of carbon and nitrogen sequestration in *A. azotica*. At the same time, future research on the visualization technology is prospected. This review is of great scientific significance for understanding the mechanism of carbon and nitrogen sequestration and the difference in nitrogen fixation efficiency of different *A. azotica* strains in soil. It provides a theoretical basis for reducing the use of chemical fertilizers and improving soil fertility in agricultural production.

**Keywords:** single cell; *Anabaena azotica*; nano-secondary ion mass spectrometry; Raman spectrum; stable isotope probing

土壤被视为地球上最复杂的介质之一,其复杂性从宏观的生态系统规模延伸到微观的单个微团聚体。在微观尺度上,微生物群落、有机物和矿物颗粒之间的纳米-微米尺度的相互作用被认为控制着土壤碳、养分和污染物等的归宿<sup>[1-4]</sup>。

长期的人为活动,如化肥过量施加,导致土壤酸化和板结问题日益严重,迫使全球土壤学家寻求更有效的化肥替代途径和方法<sup>[5-7]</sup>。固氮鱼腥藻因其优良的碳氮固定能力而备受研究者关注,现已研发成为生物有机肥。尽管已有研究证明施

加固氮鱼腥藻能够提升土壤肥力、减少化肥施加量<sup>[8-9]</sup>, 但其在土壤中的碳氮固存机制和不同菌株固存效率差异解析仍需进一步研究。因此, 从单细胞水平对来自土壤中的固氮鱼腥藻菌株进行筛选和碳氮固存过程的研究十分关键。目前, 纳米二次离子质谱法与稳定同位素标记结合(nano-secondary ion mass spectrometry-stable isotopic probing, NanoSIMS-SIP)和拉曼光谱成像与稳定同位素标记结合(Raman spectroscopy imaging-stable isotopic probing, Raman-SIP)是针对固氮鱼腥藻发生在单细胞水平上的复杂而动态的元素变化过程的主要有效研究手段。这两种技术能够在纳米-微米尺度上对固氮鱼腥藻进行单细胞定量定位成像分析, 可视化细胞的代谢特征和微生物群落组成变化。这对研究解析固氮鱼腥藻的生理及分子转化过程、探究其生物菌剂的施用方法和对土壤提质增效的作用具有深远意义。

## 1 固氮鱼腥藻的碳氮固存过程

固氮鱼腥藻(*Anabaena azotica*)属于蓝藻门念珠藻科鱼腥藻属。作为光能自养型微生物, 固氮鱼腥藻具备固存碳氮能力, 是一种优质的天然微生物肥料<sup>[10]</sup>。固氮鱼腥藻由营养细胞与异形细胞构成。营养细胞的原生质体均匀或具有颗粒, 内部充满许多伪空胞, 能进行类似于高等植物的光合作用, 发挥固碳功能。异形胞与营养细胞形态相同, 一条藻丝上通常有多个异形胞, 单个间生。成熟的异形胞具有两端的颈状结构和一个厚的外包被层, 外包被层由减少氧气通过的糖脂层和保护糖脂层的多糖层构成<sup>[11]</sup>。异形胞通过固氮酶在体内微氧环境中发挥固氮作用<sup>[12]</sup>。具体来说, 在固氮酶的催化下, 异形胞将空气中的 $N_2$ 转化为 $NH_3$ 和 $NH_4^+$ 等, 进而形成氨基酸并提供给营养细胞。通常, 碳代谢产物从营养细胞向

异形细胞转移, 而固定的氮和碳氮代谢产物则从异形胞向营养细胞转移。在固氮鱼腥藻中, 从营养胞中获得的含碳的代谢物通常不会在异形胞中积累, 而是用于呼吸(释放 $CO_2$ )以促进 $N_2$ 固定和结合固定氮。然后将其作为氨基酸等转移回营养细胞, 以满足固氮鱼腥藻本身的生长所需。当周围环境中的氮素浓度充足时, 固氮鱼腥藻通过吸收 $NO_3^-$ 、 $NO_2^-$ 等物质来满足自身生长所需。相反, 当外界生物可用氮缺乏时, 约有5%–10%的固氮鱼腥藻营养细胞在24 h内分化成异形胞以缓解其氮限制<sup>[13-14]</sup>。固氮鱼腥藻的固碳、固氮和碳氮循环依赖于细胞间的交流, 这是一个复杂的动态过程。在这个过程中, 碳氮元素的交换和流动会随外界因素的影响而改变。此外, 营养细胞向异形胞的分化受到外界养分元素的调控, 而这一分化过程伴随着单细胞层面上多种碳、氮等代谢物质的变化<sup>[15]</sup>。

## 2 单细胞稳定同位素技术应用

### 2.1 稳定同位素探针技术原理

稳定同位素探针技术(stable isotopic probing, SIP)是一种使用稳定同位素作为示踪剂的分析方法。其原理是将目标生物暴露于碳氮等生命基本元素的稳定同位素富集的基质中, 目标生物通过新陈代谢将这部分稳定同位素吸收同化至体内。研究者通常利用质谱、核磁共振等手段确定稳定同位素的存在及含量, 将碳氮等物质代谢过程与复杂的微生物群落组成耦合<sup>[16-17]</sup>。稳定同位素探针技术为揭示复杂环境中微生物代谢分子机制提供有效手段。

研究表明, 面对复杂环境中多重外界条件的胁迫, 同一种群的微生物在基因转录和翻译、蛋白活性及代谢物丰度等方面存在显著异质性<sup>[18]</sup>。单一的SIP应用以群体细胞为研究对象, 无法反映出细胞间的异质性。为更直观、深入地探究目

标生物的细胞内部构成及细胞间的代谢过程,需要将单细胞水平研究手段与稳定性同位素探针技术相结合。纳米二次离子质谱法(NanoSIMS-SIP)和单细胞拉曼光谱(single-cell Raman)作为成熟的单细胞分析技术,通过与稳定性同位素探针技术相结合,可实现在单细胞水平上解析细胞代谢和微生物群落组成变化。

## 2.2 纳米二次离子质谱法与稳定同位素标记结合技术应用

纳米二次离子质谱技术(NanoSIMS)结合高分辨率显微成像技术和同位素示踪技术,可实现在单细胞水平上对细胞的代谢特征和微生物群落组成变化进行成像分析。这项可视化技术在土壤微生物微观生态学研究中具有巨大潜力和应用前景<sup>[19]</sup>。NanoSIMS 技术原理是通过 Cs<sup>+</sup>或 O<sup>-</sup>等离子源在静电场加速后形成的一次离子束轰击样品表面,激发(溅射)出正负二次离子,然后利用磁场分离出具有不同质荷比的二次离子,接着利用法拉第杯或电子倍增器测定二次离子强度,从而通过计算结果得出样品所含元素及同位

素丰度<sup>[20-21]</sup>。实际操作流程包括固氮鱼腥藻的稳定同位素标记培养、样品固定、脱水、树脂包埋或导电镀膜处理以及制备薄片,最后通过 NanoSIMS 进行高分辨率成像分析,实现在单细胞水平上示踪元素通量和识别复杂环境样品中的代谢活跃微生物个体(图 1)<sup>[22-24]</sup>。

NanoSIMS 技术已经成功应用于许多研究项目中。例如,2006年,Lechene等<sup>[25]</sup>首次利用 NanoSIMS 对固氮海洋细菌涂氏船蛆杆菌(*Teredinibacter turnerae*)进行单细胞成像分析,研究其固氮特性。Popa等<sup>[26]</sup>利用稳定同位素标记和 NanoSIMS,通过结合 H<sub>13</sub>CO<sub>3</sub>和 <sup>15</sup>N<sub>2</sub>,研究了碳、氮元素在类颤鱼腥藻(*Anabaena oscillarioides*)中的富集情况,表征了细胞发育、单个细胞组成的变化以及细胞在代谢物交换中的作用。Herrmann等<sup>[27]</sup>采用土壤中的荧光假单胞菌作为“活性”微生物模型,在含有 <sup>15</sup>N-硫酸铵的培养基中进行孵育培养,随后将提取出的细胞悬浮液投加至石英基白砂或土壤中,并加入树脂,通过切片处理制成可供 NanoSIMS 上机分析的样

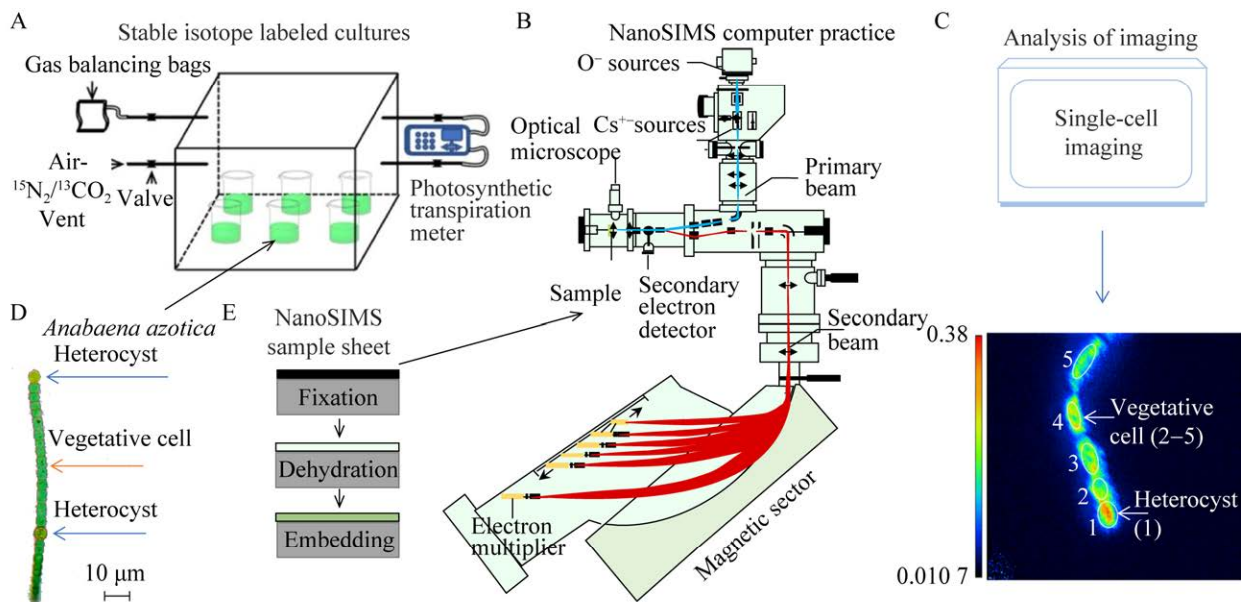


图 1 固氮鱼腥藻 NanoSIMS 上机操作流程<sup>[12,21]</sup>

Figure 1 Flow chart of NanoSIMS on *Anabaena azotica*<sup>[12,21]</sup>. A: Stable isotope labeled cultures. B: NanoSIMS computer practice. C: Analysis of imaging. D: *Anabaena azotica* sample. E: NanoSIMS sample sheet.

品。结果发现在土壤结构中可以有效识别出富含 $^{15}\text{N}$ 的荧光假单胞菌, 这表明 NanoSIMS 技术可以应用于研究土壤微生物的活动与非均质土壤基质的空间结构<sup>[27]</sup>。

此外, NanoSIMS 技术还被用于探究土壤有机物和无机物的元素组成、植物-土壤微生物之间的碳氮及养分周转动力学、土壤微结构及矿物组成以及土壤中污染物质的归宿等<sup>[2-4,28-30]</sup>。例如, Wang 等<sup>[2]</sup>将 NanoSIMS 与 SIP 结合, 采用 $^{15}\text{N}_2$  标记法定量研究了水稻土壤中微生物的固氮作用, 结果表明 $^{15}\text{N}$ 在 $^{15}\text{N}_2$ 标记的 SIP 梯度组分中被纳入土壤 DNA, 且念珠藻(*Nostocacels*)和真枝藻(*Stigonematales*)是生物固氮的主要贡献者。相关研究突出了 NanoSIMS-SIP 技术对研究土壤基质中微生物的空间分布及其养分循环等生物过程的重要性。

研究者通常将 NanoSIM-SIP 与荧光原位杂交技术(*fluorescence in situ hybridization*, FISH)、催化报告沉积荧光原位杂交技术(*catalyzed reporter deposition-fluorescent in situ hybridization*, CARD-FISH)或卤素原位杂交(*halogen in situ hybridization*, HISH)等联用<sup>[24,31-33]</sup>, 以应对复杂的共生体系。FISH 或 CARD-FISH 采用特定的 DNA 或 RNA 荧光探针, 基于碱基互补配对原则, 使其与目标待测细胞的特异核酸序列(如 16S rRNA 基因)专一性结合。通过检测目标微生物的荧光信号, 可以实现对不同微生物种类的鉴别。例如, Arandia-Gorostidi 等<sup>[34]</sup>使用 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 同位素孵育、NanoSIMS-SIP 与 CARD-FISH 相结合的分析方法, 示踪了丹麦细柱藻(*Leptocylindrus danicus*)向环境中不同细菌群落的碳和氮的转移过程, 从而评估了硅藻-细菌组合对聚集体内及周围水体的碳氮循环的重要性。

此外, NanoSIMS-SIP 还可与透射电子显微

镜(*transmission electron microscopy*, TEM)和扫描电子显微镜(*scanning electron microscope*, SEM)等技术联用以进行同位素定位定量分析<sup>[35-36]</sup>。这种方式通过先定位后分析, 有效提高了 NanoSIMS 样品的分析效率和准确度。例如, Finzi-Hart 等<sup>[36]</sup>利用 NanoSIMS-TEM 及稳定同位素 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 对束毛藻(*Trichodesmium*)的碳氮固定过程进行定量分析, 发现新固定的碳和氮主要集中于藻青素颗粒中, 并且 $\text{CO}_2$ 固定效率在上午 10 点最高, 而 $\text{N}_2$ 固定效率则在上午 12 点最高, 这与光合固氮微生物的代谢时空分布特征完全吻合。这些研究结果强调了即使在复杂的共生体系中, 这类联用技术也能快速准确地定位到单个细胞, 并适用于各种不同的场景<sup>[37]</sup>。

NanoSIMS 单细胞稳定同位素可视化技术在应用于土壤固氮鱼腥藻的研究时, 也存在一定的限制。由于在土壤环境中, NanoSIMS 设备无法直接对土壤颗粒中的微生物进行单细胞水平分析, 需要将目标微生物从土壤介质中分离。这是因为土壤中的微生物通常在高负荷的背景土壤颗粒中高度分散。此外, 有机物、无机物等其他物质的背景颗粒负荷将严重影响对目标微生物的单细胞水平分析的准确度。因此, 在进行上机分析之前, 需要提高目标微生物从土壤颗粒或其他介质中提取的浓度。同时, 还需要解决如何提高细胞分离效率和细胞回收率的问题, 以及降低脱离过程本身对微生物群落结构和功能的影响。这些都是利用 NanoSIMS 在单细胞水平上研究土壤微生物机制时需要努力克服的难题。

### 2.3 单细胞拉曼光谱与稳定同位素标记结合技术应用

拉曼光谱是一种分子振动光谱, 其工作原理是入射光与样品分子相互作用后产生的非弹性散射光<sup>[38]</sup>。通过测量入射光子反向波长和能量转换光子反向波长的差值, 可以得到拉曼光谱的

波数。对不同频率的入射光产生的拉曼散射光谱进行分析,能准确获得物质化学分子的组成和结构信息。由于拉曼光谱反映了化学键的振动频率,当轻原子被较重的同位素取代时,拉曼带会向较低的波数移动,提供一种灵敏且简单的信号峰,用以确定主要的稳定同位素消费者和消费场所,并可以结合成像系统定位、定量确定样品的功能或活性<sup>[39-42]</sup>。Raman-SIP 作为一种非侵入式技术,常用于单细胞水平研究微生物的代谢和生理状态,为细菌鉴定、细胞类型鉴别、生化成像、生物聚合物分析、代谢和功能表征提供有力工具<sup>[43-46]</sup>。本课题组利用 Raman-SIP 技术在土壤介质中展开一系列研究,并取得了一定成果。通过单细胞拉曼光谱结合 D<sub>2</sub>O 稳定同位素标记对活体土壤细菌结构和生理代谢进行研究,从单细胞水平揭示了微生物生理代谢和残体对氮缺乏和充足条件下土壤有机碳封存的潜在调控机制<sup>[47]</sup>。此外,利用单细胞拉曼技术鉴别开发出高效耐铝的合成菌群(synthetic community, SynCom),通过田间试验评估了 SynCom 促进水稻生长的有效性,阐明了 SynCom 在水稻抗铝和促磷吸收方面的潜在机制<sup>[48]</sup>。研究充分说明 Raman-SIP 是一种在单细胞水平阐明微生物代谢机制的有效手段。土壤微生物单细胞可以根据荧光标记、大小形态、光学性质以及拉曼光谱进行分选,分选出的细胞可以进行稳定同位素标记培养,以探究细胞生理代谢过程。主流的分选技术包括拉曼激光镊分选(laser tweezer Raman sorting, LTRS)、微流体装置分选和拉曼活细胞弹射技术(Raman activated cell ejection, RACE)等<sup>[49-54]</sup>。Li 等<sup>[55]</sup>以 <sup>13</sup>C 标记的非为靶标,开发了一种耦合磁性纳米粒子介导的离析与稳定同位素探测相结合(magnetic-nanoparticle-mediated isolation-stable isotopic probing, MMI-SIP)和拉曼活化细胞分选(Raman-activated cell sorting,

RACS)的新方法,从多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)污染的废水中鉴定降解菲的活性细菌细胞。研究结果表明 MMI-SIP-RACS 显著富集了活性非降解物,并成功分离出具有代表性的单细胞。Li 等<sup>[56]</sup>通过 Raman-D<sub>2</sub>O 同位素标记和靶向宏基因组联用技术,示踪了土壤原位活性抗生素耐药菌,量化了其表型耐药水平,并结合单细胞靶向分选与测序揭示了土壤高活性耐药菌的抗性组和移动组。Raman-SIP 与细胞分选技术的结合,为研究者剖析复杂土壤环境中的单个微生物细胞生态代谢提供巨大帮助。

将单细胞拉曼光谱与稳定同位素标记技术相结合,可以通过测定 SIP 诱导的特征拉曼位移来量化同位素标记底物的代谢同化,实现土壤固氮蓝藻碳氮固定过程的可视化。在研究固氮蓝藻生理功能时,一般选择 <sup>15</sup>N、<sup>13</sup>C 和 <sup>2</sup>D 等稳定同位素来替代原始同位素<sup>[57-59]</sup>。通过将固氮蓝藻菌株置于含有稳定同位素标记底物中培养,可以观察到蓝藻新陈代谢过程中新合成的细胞组分的化学键变化,从而导致拉曼图谱中的振动峰发生红移。这种红移程度与稳定同位素在细胞中的同化量显著相关且直接反映了细胞活性<sup>[60]</sup>。

因此,单细胞拉曼光谱技术与稳定同位素技术的联用开始应用于土壤固氮蓝藻碳氮循环机制等领域的研究<sup>[61-64]</sup>。同时,拉曼光谱提供的指纹图谱有助于识别不同固氮蓝藻细胞的活性及细胞分化过程。然而,由于蓝藻细菌类囊体膜中的光合色素-蛋白质复合物等成分发出的强烈自身荧光可能掩盖较弱的拉曼信号,对拉曼散射光谱造成干扰<sup>[42]</sup>。为减轻这种干扰,研究者采用改变入射光源的方法,如采用近红外、红外或紫外激光激发光谱等<sup>[59-60]</sup>。同时,为防止固氮蓝藻体内色素的影响,一些研究者提出了使用特定波长激发光进行细胞拉曼成像的新方法。例如,

Tamamizu 等<sup>[63]</sup>利用 976 nm 的激发波长研究了固氮鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) 和胶须藻 (*Rivularia*) M-261 营养细胞和异形胞的拉曼光谱, 发现 *Rivularia* M-261 的异形胞相对拉曼散射强度显著高于 *A. variabilis*。Ishihara 等<sup>[64]</sup>则利用 785 nm 近红外光激发光源研究了丝状固氮蓝藻 (*Anabaena* sp. pcc) 7120 营养细胞与异形胞的拉曼光谱, 证实了在细胞分化过程中, 异形胞的化学成分相对稳定, 而营养细胞的组成成分随细胞分化的状态而变化。

拉曼光谱技术日趋成熟, 其在解决土壤等复杂群落中细菌单细胞水平的研究问题上展现出巨大的潜力。然而, 尽管单细胞拉曼光谱在实现高分辨率、高准确度和非破坏性检测方面已经取得了一定的进展, 但是在降低非目标物质的信号干扰、提高目标物质拉曼信号的定位效率以及多重标记的准确性等方面仍然有待提升。

NanoSIMS 和单细胞拉曼相关联合技术本

身各有优劣且应用场景不同(表 1), 研究者可根据研究目的自行选择。同时, 可以尝试将 NanoSIMS 和单细胞拉曼相关技术串联起来(图 2)。通过这些方法, 可以将固氮微生物的身份、形态、生物化学和生理学联系在一起, 从而推动 NanoSIMS 与拉曼光谱两者的互补发展, 形成一套对目标菌株进行标准可视化研究的新流程。这将有助于更好地获取固氮微生物的生物信息并挖掘其功能基因。

### 3 单细胞稳定同位素技术定量可视化固氮鱼腥藻碳氮固存过程

碳和氮的固存是光能自养固氮鱼腥藻确保其碳氮需求并促进与其他物种代谢相互作用的主要过程。为了直接监测活的单细胞中这些高度动态和空间分辨的相互作用, 研究者通常采用将单细胞技术与稳定同位素探针技术相结合, 如将

表 1 单细胞稳定同位素可视化技术差异与应用场景

Table 1 Differences in single-cell stable isotope visualization techniques and application scenarios

Technological disparity	NanoSIMS	Raman spectroscopy
Spatial resolution	50 nm	0.5–1.0 $\mu\text{m}$
Application scenarios	Microbial physiological and ecological characteristics, cell composition and systematic classification information, intercellular metabolic processes, microbial activity and spatial distribution	Bacterial identification, cell type identification, biochemical imaging, biopolymer analysis, metabolic and functional characterization
Sample requirements	No deflation characteristics, appropriate sample size, good flatness	Solid, liquid, gas, powder, colloid, without sample preparation
Sample on machine impaired	Yes	No
Downstream studies	Affected	Unaffected
Sample test cost	High	Common
United technologies	SIP, FISH, CARD-FISH, HISH, SEM, TEM, XRF	SIP, Raman imaging, LTRS, RACE, RMCS
Technology limitation	High sample preparation requirements, sample volume limitation, single-cell studies cannot be performed <i>in situ</i> , isolation is required	Non-target signal interference, single-cell studies cannot be performed <i>in situ</i> , isolation is required
Technology upgrade	No upgrade	Resonance Raman, surface-enhanced Raman, coherent anti-stokes Raman, stimulated Raman, resonance raman

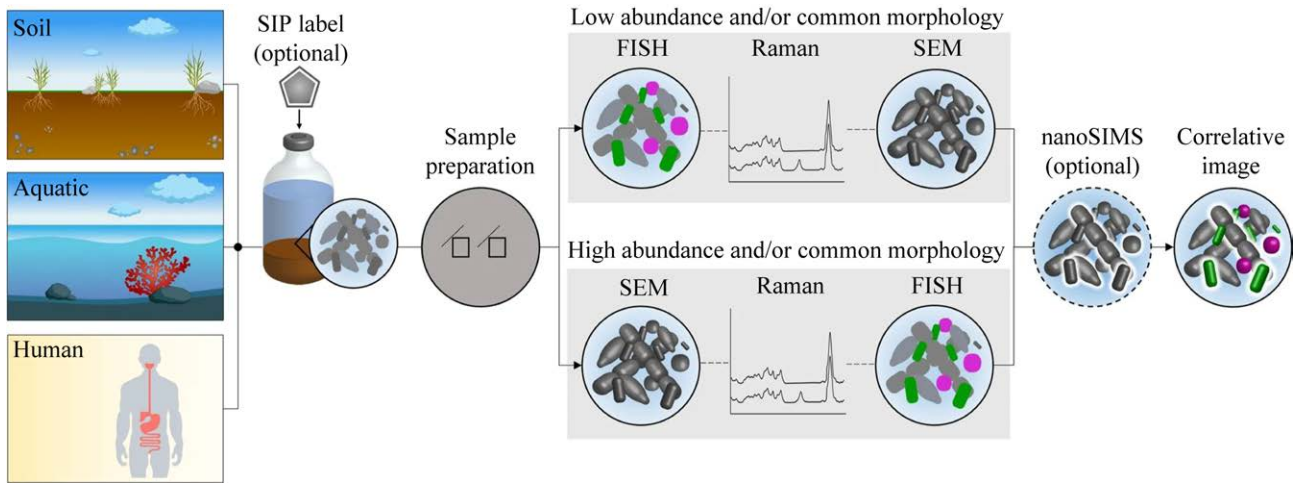


图 2 NanoSIMS 与单细胞拉曼相关技术结合示意图<sup>[65]</sup>

Figure 2 Schematic diagram of related techniques between NanoSIMS and single-cell Raman<sup>[65]</sup>. Environmental samples can be taken and incubated in the presence of an isotope-containing substrate to label active community members or study substrate assimilation. Next, the biomass is chemically fixed and placed on a stainless steel coupon. SEM is used to study cell morphology. Raman is used to determine the biochemical makeup as well as substrate assimilation of individual cells. rRNA-targeted FISH reveals the taxonomic identity of cells. As a final step, NanoSIMS can be used to study the elemental and isotopic composition of the sample at higher spatial resolution and sensitivity than possible by Raman.

NanoSIMS、单细胞拉曼显微光谱法与微流体培养系统、荧光原位杂交和稳定同位素探测相结合的方法。通过高分辨率成像，在单细胞水平上跟踪活性微生物组合中的代谢发生、速率和生理变化<sup>[63-64]</sup>。

通常情况下，将固氮鱼腥藻置于缺乏组合氮的 BG-11 培养基中培养，诱导其进行异形胞分化，在此过程中定期采样可量化营养细胞向异形胞的转化速率。随后利用稳定同位素  $^{13}\text{C}$  和  $^{15}\text{N}$  进行孵育培养，通过 NanoSIMS 和单细胞拉曼显微光谱法成像来量化碳和氮在细胞内的同化和分布情况，以此来探究固氮鱼腥藻的碳氮固存机制。

与 Raman-SIP 相比，NanoSIMS-SIP 能够在更高分辨率尺度上对固氮鱼腥藻的碳氮固存过程进行可视化研究。例如 Nieves-Mori3n 等<sup>[12]</sup>通过在缺乏组合氮的培养基中培养固氮鱼腥藻 48 h，然后稳定同位素  $^{13}\text{C}$  和  $^{15}\text{N}$  孵育培养 15 min、1 h、4 h 和 20 h，诱导固氮鱼腥藻进行

异形胞分化，最后利用 NanoSIMS 成像来量化碳和氮在细胞内的同化和分布情况。结果表明，从营养细胞中获得的大多数 C 化合物在异形胞体内被消耗，以促进  $\text{N}_2$  固定，而新固定的 N 先富集于异形胞颈部，然后随着细胞生长分化需求，从异形胞向营养细胞逐层递减转移<sup>[12]</sup>。

NanoSIMS-SIP 技术本身受到样品制备过程中细胞失活的限制，无法对同一细胞进行长时间序列的观察与探究。因此只能通过频繁采样实现量化研究。然而，Raman-SIP 与微流体培养系统相结合的方法弥补了这一缺陷，实现了实时跟踪活性固氮鱼腥藻细胞的代谢发生、速率和生理变化。

在利用单细胞拉曼光谱技术研究固氮鱼腥藻碳氮固定机制的过程中，首先需要确定与碳和氮固存相关的拉曼信号峰。Cui 等<sup>[66]</sup>在使用单细胞拉曼探究固氮蓝藻  $\text{N}_2$  固定机制时，为确定关键的拉曼生物标志物，在无氮培养基中培养菌种，通过梯度增加  $^{15}\text{N}_2$  浓度，观察拉曼各峰值



变化情况,发现 0.36%  $^{15}\text{N}_2$  中 1 111、1 146  $\text{cm}^{-1}$  和 1 285  $\text{cm}^{-1}$  处的谱带在 99.36%  $^{15}\text{N}_2$  处移动至 1 103、1 133  $\text{cm}^{-1}$  和 1 280  $\text{cm}^{-1}$ ; 这种变化与生物可利用的  $^{15}\text{NO}_3^-$  培养的蓝藻中变化相同,这证明两者合成了相同的  $^{15}\text{N}$  生物组分,且  $^{15}\text{N}_2$  在新合成的生物分子中的固定是由  $^{15}\text{N}$  诱导的变化。

在找到这些信号峰后,研究人员还需要对其进行再分析,以确定这些变化是否可以用于量化蓝藻碳和氮固定活性/速率。通常可以采用层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、偏最小二乘法(partial least squares, PLS)、主成分回归(principal component regression, PCR)和主成分分析(principal component analysis, PCA)等方法来识别和量化拉曼光谱变化情况<sup>[67-71]</sup>。同时,通过同位素比质谱仪(isotope ratio mass spectrometer, IRMS)进行整体分析,评估拉曼信号峰变化情况定量细胞中碳、氮丰度的可靠性。当确定两者呈线性相关时,即可实现量化。例如,

Ishihara 等<sup>[64]</sup>分析发现,  $^{15}\text{N}$  诱导的光谱变化的主成分分析评分与  $^{15}\text{N}_2$  的供应量呈线性相关,且 IRMS 量化的  $^{15}\text{N}$  丰度与代表  $^{15}\text{N}$  诱导的拉曼光谱变化的 PCA 评分呈线性相关( $R^2=0.9794$ ),清楚地说明两者之间的线性关系,可以实现量化蓝藻的固定活性/速率。

为追踪碳氮在活性蓝藻中及藻间的固定和转移,人们研发了适合固氮蓝藻的微流体培养系统。这种微流体培养系统能够同时实现细胞培养、显微镜观察和原位拉曼测定,使细胞和培养基实现流入和流出。通过此装置利用  $^{15}\text{N}$  或  $^{13}\text{C}$  分别培养固氮蓝藻,并在微流体培养系统中直接上机测量。在不同时间段对同一单细胞进行拉曼图谱绘制及显微镜成像,基于细胞  $^{15}\text{N}$  和  $^{13}\text{C}$  含量与其诱导的光谱变化的线性关系,确定营养细胞与异形胞中  $^{15}\text{N}$  和  $^{13}\text{C}$  富集的时间和空间动力学变化,并通过拉曼映射图像中的颜色编码进行可视化。

单细胞实时成像分析研究结果表明(图 3),

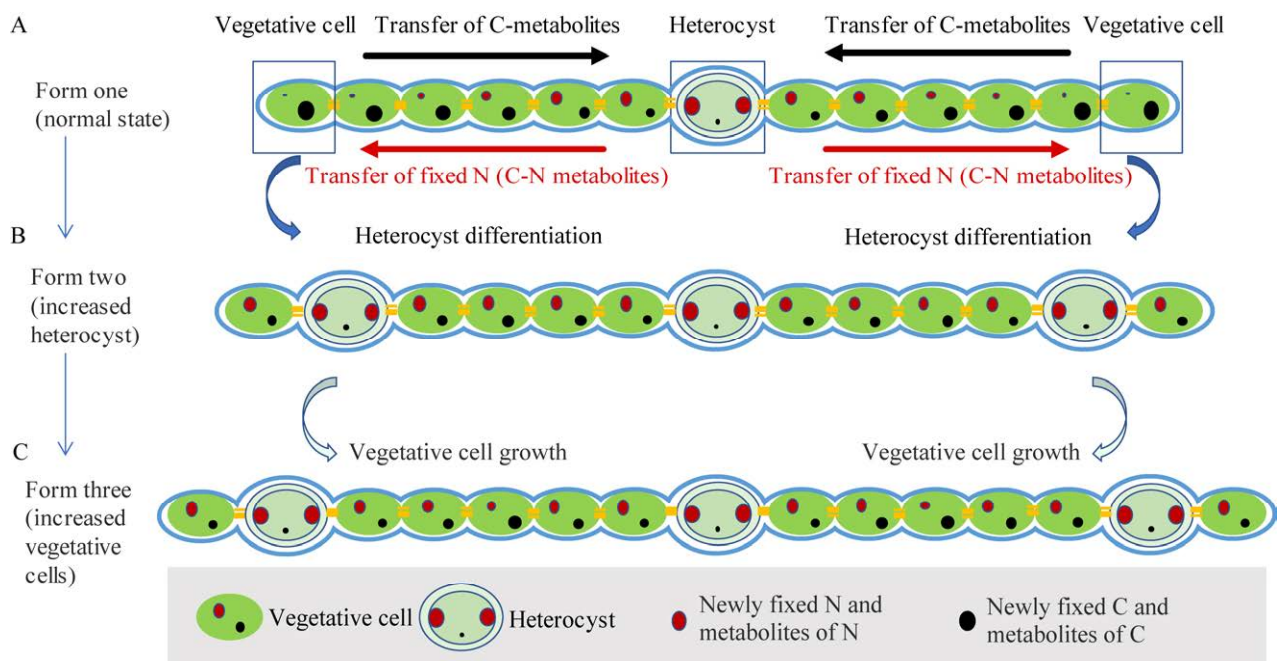


图 3 固氮鱼腥藻碳氮固存过程示意图<sup>[12-13]</sup>

Figure 3 Schematic diagram of C and N sequestration of *Anabaena azotica*<sup>[12-13]</sup>. Different forms (A: Normal state. B: Increased heterocyst; C: Increased vegetative cells) of *Anabaena azotica* resulting from changes in external conditions.

最初  $^{13}\text{C}$  在营养细胞中显著富集, 而随着时间的推移, 营养细胞和异形胞中的  $^{13}\text{C}$  含量开始增多。其中更多的新固定的  $^{13}\text{C}$  从营养细胞分配到异形胞中, 直到最后达到平衡分布。相反地,  $^{15}\text{N}$  的最初固定和富集发生在异形胞的两端, 随着细胞生长的需要, 新固定的  $^{15}\text{N}$  开始从异形胞向营养细胞转移。随后营养细胞  $^{15}\text{N}$  中的含量开始增多, 其中异形胞中的含量明显高于相邻的营养细胞。这种碳氮的相互转移是营养细胞与异形胞之间能量物质的转化和生长的相互依赖关系。异形胞缺乏光合系统, 需要依赖营养细胞提供固定和输出氮源所需的碳源和能量, 而营养细胞同时需要输入新的氮源来维持光合作用、细胞发育和分化。通过单细胞实时成像分析, 可以基于  $^{15}\text{N}$  和  $^{13}\text{C}$  随时间的富集程度来计算单细胞通量。此外, 单细胞碳氮固定率计算考虑了孵育时间内固定在单个异形胞(营养细胞)中的  $^{15}\text{N}$  和  $^{13}\text{C}$  的净固定率, 而单细胞  $^{15}\text{N}(^{13}\text{C})$  转移速率计算则计算了随时间推移转移到异形胞与营养细胞中的  $^{15}\text{N}(^{13}\text{C})$  的量。因此, 通过单细胞稳定同位素成像分析, 实现了量化单个活细胞内和细胞间的碳氮固定和转移, 这对于研究菌株碳氮固存机制具有重要意义。

## 4 结论与展望

NanoSIMS 和单细胞拉曼光谱利用其纳米-微米级的超高空间分辨率和高检测灵敏度, 通过结合稳定同位素标记, 实现了在单细胞水平上深入解析固氮蓝藻的碳氮固存及代谢物的转移。这为进一步研究土壤复杂环境下微生物群落中的已知或未知的功能菌株的生态生理学提供有效手段, 同时也增加了挖掘和调控土壤功能微生物的途径。两者技术的不断改进为土壤科学领域带来新的见解和突破。通过单细胞可视化技术研究

固氮蓝藻的碳氮固存机制, 鉴别筛选出优质的天然微生物肥料, 为农业生产实际应用和土壤健康控制提供了有效途径。然而, 目前两者在土壤学方向的研究应用发现, 尽管已经掌握了将 NanoSIMS 和单细胞拉曼光谱有效应用于土壤微生物研究的工作流程, 但在土壤样品制备过程中, 两者都面临着无法直接对土壤样品进行单细胞水平可视化研究的难题。这是受土壤本身的复杂性特质所限制, 需要通过将微生物与土壤颗粒本身进行脱离处理, 从而达到上机条件。脱离过程本身对细胞分离效率、细胞完整性以及微生物群落结构和功能等都会造成影响。因此, 如何消除或降低脱离过程本身所造成的负面作用, 提高目标生物的分离效率, 是日后利用单细胞可视化技术研究土壤环境中的微生物所必须克服的难题。

从可视化技术本身出发, 考虑到设备造价昂贵稀缺的 NanoSIMS 技术和其在样品制备过程中的破坏失活, 导致无法较好地进行下游生物分子研究等缺陷, 需要在未来降低研究成本, 减少研究过程对样品的破坏性等方面努力。在单细胞拉曼光谱方面, 需要在提高空间分辨率和检测灵敏度的同时, 降低非目标物质的信号干扰、提高目标物质拉曼信号定位效率和多重标记准确性等, 从而能够更快速准确地寻找到作为生物标志物的拉曼信号峰。同时, 将 SIP-FISH-SEM-NanoSIMS 等技术串联应用于土壤固氮微生物的研究过程中, 将固氮微生物的身份、形态、生物化学和生理学联系在一起, 推进 NanoSIMS 与拉曼光谱两者互补, 形成对目标菌株的标准可视化研究流程。单细胞可视化技术在加快对微观的土壤生物世界的研究进程的同时, 也为促进农业生产、土壤环境保护作出重要贡献。

## 参考文献

- [1] JIANG MT, DELGADO-BAQUERIZO M, YUAN MM, DING JX, YERGEAU E, ZHOU JZ, CROWTHER TW, LIANG YT. Home-based microbial solution to boost crop growth in low-fertility soil[J]. *New Phytologist*, 2023, 239(2): 752-765.
- [2] WANG XJ, BEI QC, YANG W, ZHANG H, HAO JL, QIAN L, FENG YC, XIE ZB. Unveiling of active diazotrophs in a flooded rice soil by combination of NanoSIMS and  $^{15}\text{N}_2$ -DNA-stable isotope probing[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2020, 56(8): 1189-1199.
- [3] MAYALI X, WEBER PK, NUCCIO E, LIETARD J, SOMOZA M, BLAZEWCZ SJ, PETT-RIDGE J. Chip-SIP: stable isotope probing analyzed with rRNA-targeted microarrays and NanoSIMS[M]// *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2019: 71-87.
- [4] MOOSHAMMER M, KITZINGER K, SCHINTLMEISTER A, AHMERKAMP S, NIELSEN JL, NIELSEN PH, WAGNER M. Flow-through stable isotope probing (flow-SIP) minimizes cross-feeding in complex microbial communities[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(1): 348-353.
- [5] SHANG SS, SONG MH, WANG CM, DOU XM, WANG JX, LIU FF, ZHU CY, WANG SQ. Decrease of nitrogen cycle gene abundance and promotion of soil microbial-N saturation restrain increases in  $\text{N}_2\text{O}$  emissions in a temperate forest with long-term nitrogen addition[J]. *Chemosphere*, 2023, 338: 139378.
- [6] ZHAO XY, ZHU D, TAN J, WANG R, QI GF. Cooperative action of fulvic acid and *Bacillus paralicheniformis* ferment in regulating soil microbiota and improving soil fertility and plant resistance to bacterial wilt disease[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(2): e0407922.
- [7] SAMORAJ M, MIRONIUK M, WITEK-KROWIAK A, IZYDORCZYK G, SKRZYPCZAK D, MIKULA K, BAŚLADYŃSKA S, MOUSTAKAS K, CHOJNACKA K. Biochar in environmental friendly fertilizers-prospects of development products and technologies[J]. *Chemosphere*, 2022, 296: 133975.
- [8] ZHANG JL, SONG XN, WEI H, ZHOU WC, PENG CR, LI DH. Effect of substituting nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing cyanobacteria on yield in a double-rice cropping system in southern China[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33(4): 2221-2232.
- [9] ZHOU YW, BAO JQ, ZHANG DH, LI YJ, LI HS, HE HZ. Effect of heterocystous nitrogen-fixing cyanobacteria against rice sheath blight and the underlying mechanism[J]. *Applied Soil Ecology*, 2020, 153: 103580.
- [10] CHAURASIA AK, APTE SK. Improved eco-friendly recombinant *Anabaena* sp. strain PCC7120 with enhanced nitrogen biofertilizer potential[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(2): 395-399.
- [11] 周芳, 方仙桃, 高宏. 固氮蓝藻的异形胞研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(2): 524-527.
- ZHOU F, FANG XT, GAO H. Advances on the heterocysts of the nitrogen-fixing cyanobacteria[J]. *Journal of Anhui Agricultural*, 2013, 41(2): 524-527 (in Chinese).
- [12] NIEVES-MORIÓN M, FLORES E, WHITEHOUSE MJ, THOMEN A, FOSTER RA. Single-cell measurements of fixation and intercellular exchange of C and N in the filaments of the heterocyst-forming *Cyanobacterium Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. *mBio*, 2021, 12(4): e01314-21.
- [13] ZENG XL, ZHANG CC. The making of a heterocyst in cyanobacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2022, 76: 597-618.
- [14] BASELGA-CERVERA B, JACOBSEN KA, FORD DENISON R, TRAVISANO M. Experimental evolution in the cyanobacterium *Trichormus variabilis*: increases in size and morphological diversity[J]. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 2023, 77(5): 1216-1225.
- [15] XING WY, LIU J, ZHANG JY, ZENG XL, ZHANG CC. A proteolytic pathway coordinates cell division and heterocyst differentiation in the *Cyanobacterium Anabaena* sp. PCC 7120[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(36): e2207963119.
- [16] GODIN JP, FAY LB, HOPFGARTNER G. Liquid chromatography combined with mass spectrometry for  $^{13}\text{C}$  isotopic analysis in life science research[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2007, 26(6): 751-774.
- [17] 王万洁, 侯兴旺, 刘稷燕, 江桂斌. 传统稳定同位素技术在环境科学领域的应用及研究进展[J]. *环境化学*, 2021, 40(12): 3640-3650.
- WANG WJ, HOU XW, LIU JY, JIANG GB. Application and research progress of traditional stable isotope technology in environmental science[J]. *Environmental Chemistry*, 2021, 40(12): 3640-3650 (in Chinese).
- [18] 陈子熙, 陈磊, 张卫文. 单细胞尺度下的微生物学研究: 意义与方法[J]. *微生物学报*, 2017, 57(6): 920-931.
- CHEN ZX, CHEN L, ZHANG WW. Microbiology at single-cell scale: significance and approaches[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(6): 920-931 (in Chinese).

- [19] VIDAL A, KLÖFFEL T, GUIGUE J, ANGST G, STEFFENS M, HOESCHEN C, MUELLER CW. Visualizing the transfer of organic matter from decaying plant residues to soil mineral surfaces controlled by microorganisms[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 160: 108347.
- [20] HERRMANN AM, RITZ K, NUNAN N, CLODE PL, PETT-RIDGE J, KILBURN MR, MURPHY DV, O'DONNELL AG, STOCKDALE EA. Nano-scale secondary ion mass spectrometry: a new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: a review article[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(8): 1835-1850.
- [21] THOMEN A, NAJAFINOBAR N, PENEN F, KAY E, UPADHYAY PP, LI XC, PHAN NTN, MALMBERG P, KLARQVIST M, ANDERSSON S, KURCZY ME, EWING AG. Subcellular mass spectrometry imaging and absolute quantitative analysis across organelles[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 4316-4325.
- [22] SCHOFFELEN NJ, MOHR W, FERDELMAN TG, DUERSCHLAG J, LITTMANN S, PLOUG H, KUYPERS MMM. Phosphate availability affects fixed nitrogen transfer from diazotrophs to their epibionts[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(11): 2701-2713.
- [23] STUART RK, PEDERSON ERA, WEYMAN PD, WEBER PK, RASSMUSSEN U, DUPONT CL. Bidirectional C and N transfer and a potential role for sulfur in an epiphytic diazotrophic mutualism[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(12): 3068-3078.
- [24] 胡行伟, 张丽梅, 贺纪正. 纳米二次离子质谱技术 (NanoSIMS) 在微生物生态学研究中的应用[J]. *生态学报*, 2013, 33(2): 348-357.  
HU HW, ZHANG LM, HE JZ. Application of nano-scale secondary ion mass spectrometry to microbial ecology study[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(2): 348-357 (in Chinese).
- [25] LECHENE C, HILLION F, McMAHON G, BENSON D, KLEINFELD AM, KAMPF JP, DISTEL D, LUYTEN Y, BONVENTRE J, HENTSCHEL D, PARK KM, ITO S, SCHWARTZ M, BENICHOU G, SLODZIAN G. High-resolution quantitative imaging of mammalian and bacterial cells using stable isotope mass spectrometry[J]. *Journal of Biology*, 2006, 5(6): 20.
- [26] POPA R, WEBER PK, PETT-RIDGE J, FINZI JA, FALLON SJ, HUTCHEON ID, NEALSON KH, CAPONE DG. Carbon and nitrogen fixation and metabolite exchange in and between individual cells of *Anabaena oscillarioides*[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(4): 354-360.
- [27] HERRMANN AM, CLODE PL, FLETCHER IR, NUNAN N, STOCKDALE EA, O'DONNELL AG, MURPHY DV. A novel method for the study of the biophysical interface in soils using nano-scale secondary ion mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, 21(1): 29-34.
- [28] EICHORST SA, STRASSER F, WOYKE T, SCHINTLMEISTER A, WAGNER M, WOEBKEN D. Advancements in the application of NanoSIMS and Raman microspectroscopy to investigate the activity of microbial cells in soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(10): fiv106.
- [29] MUELLER CW, KÖLBL A, HOESCHEN C, HILLION F, HEISTER K, HERRMANN AM, KÖGEL-KNABNER I. Submicron scale imaging of soil organic matter dynamics using NanoSIMS-from single particles to intact aggregates[J]. *Organic Geochemistry*, 2012, 42(12): 1476-1488.
- [30] SCHWEIZER SA, COLOCHO HURTARTE LC, HÖSCHEN C, KLYSUBUN W, HARRINGTON G, PRIETZEL J. Phosphorus hotspots in pedogenic carbonate coatings determined by zoned microscale arrangement and organo-mineral interactions[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2023, 344: 90-102.
- [31] MUSAT N, STRYHANYUK H, BOMBACH P, ADRIAN L, AUDINOT JN, RICHNOW HH. The effect of FISH and CARD-FISH on the isotopic composition of <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-labeled *Pseudomonas putida* cells measured by nanoSIMS[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2014, 37(4): 267-276.
- [32] DEKAS AE, ORPHAN VJ. Identification of diazotrophic microorganisms in marine sediment *via* fluorescence *in situ* hybridization coupled to nanoscale secondary ion mass spectrometry (FISH-NanoSIMS)[M]//*Research on Nitrification and Related Processes, Part A*. Amsterdam: Elsevier, 2011: 281-305.
- [33] HALM H, MUSAT N, LAM P, LANGLOIS R, MUSAT F, PEDUZZI S, LAVIK G, SCHUBERT CJ, SINGHA B, LaROCHE J, KUYPERS MMM. Co-occurrence of denitrification and nitrogen fixation in a meromictic lake, Lake Cadagno (Switzerland)[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(8): 1945-1958.
- [34] ARANDIA-GOROSTIDI N, BERTHELOT H, CALABRESE F, STRYHANYUK H, KLAWONN I, IVERSEN M, NAHAR N, GROSSART HP, PLOUG H, MUSAT N. Efficient carbon and nitrogen transfer from marine diatom aggregates to colonizing bacterial groups[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 14949.

- [35] BANDARA CD, SCHMIDT M, DAVOUDPOUR Y, STRYHANYUK H, RICHNOW HH, MUSAT N. Microbial identification, high-resolution microscopy and spectrometry of the rhizosphere in its native spatial context[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 668929.
- [36] FINZI-HART JA, PETT-RIDGE J, WEBER PK, POPA R, FALLON SJ, GUNDERSON T, HUTCHEON ID, NEALSON KH, CAPONE DG. Fixation and fate of C and N in the *Cyanobacterium Trichodesmium* using nanometer-scale secondary ion mass spectrometry[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(15): 6345-6350.
- [37] WOEBKEN D, BUROW LC, PRUFERT-BEBOUT L, BEBOUT BM, HOEHLER TM, PETT-RIDGE J, SPORMANN AM, WEBER PK, SINGER SW. Identification of a novel cyanobacterial group as active diazotrophs in a coastal microbial mat using NanoSIMS analysis[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(7): 1427-1439.
- [38] WANG Y, HUANG WE, CUI L, WAGNER M. Single cell stable isotope probing in microbiology using Raman microspectroscopy[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 41: 34-42.
- [39] HATZENPICHLER R, KRUKENBERG V, SPIETZ RL, JAY ZJ. Next-generation physiology approaches to study microbiome function at single cell level[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(4): 241-256.
- [40] LORENZ B, WICHMANN C, STÖCKEL S, RÖSCH P, POPP J. Cultivation-free Raman spectroscopic investigations of bacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(5): 413-424.
- [41] UEDA R, YANO K. Endophytic N<sub>2</sub> fixation in sweet potato: responses to N, P, and K inputs and visualization of <sup>15</sup>N<sub>2</sub> utilizing bacterial cells *via* Raman spectroscopy[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2023, 59(3): 275-283.
- [42] WANG DQ, HE PS, WANG ZJ, LI GY, MAJED N, GU AZ. Advances in single cell Raman spectroscopy technologies for biological and environmental applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 64: 218-229.
- [43] AZEMTSOP MATANFACK G, PISTIKI A, RÖSCH P, POPP J. Raman stable isotope probing of bacteria in visible and deep UV-ranges[J]. *Life (Basel, Switzerland)*, 2021, 11(10): 1003.
- [44] LI HZ, BI QF, YANG K, ZHENG BX, PU Q, CUI L. D<sub>2</sub>O-isotope-labeling approach to probing phosphate-solubilizing bacteria in complex soil communities by single-cell Raman spectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(3): 2239-2246.
- [45] KARLO J, DHILLON AK, SIDDHANTA S, SINGH SP. Monitoring of microbial proteome dynamics using Raman stable isotope probing[J]. *Journal of Biophotonics*, 2023, 16(4): e202200341.
- [46] 刘聪, 谢伟, 何林, 张传伦. 单细胞拉曼光谱在微生物研究中的应用[J]. *微生物学报*, 2020, 60(6): 1051-1062. LIU C, XIE W, HE L, ZHANG CL. Advances in the application of Raman microspectroscopy in microbe research[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(6): 1051-1062 (in Chinese).
- [47] NI HW, JING XY, XIAO X, ZHANG N, WANG XY, SUI YY, SUN B, LIANG YT. Microbial metabolism and necromass mediated fertilization effect on soil organic carbon after long-term community incubation in different climates[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(9): 2561-2573.
- [48] LIU CY, JIANG MT, YUAN MM, WANG ET, BAI Y, CROWTHER TW, ZHOU JZ, MA ZY, ZHANG L, WANG Y, DING JX, LIU WX, SUN B, SHEN RF, ZHANG JB, LIANG YT. Root microbiota confers rice resistance to aluminium toxicity and phosphorus deficiency in acidic soils[J]. *Nature Food*, 2023, 4(10): 912-924.
- [49] PARLATAN U, BAŞAR G, BAŞAR G. Sorting of micron-sized particles using holographic optical Raman tweezers in aqueous medium[J]. *Journal of Modern Optics*, 2019, 66(2): 228-234.
- [50] XIE CG, CHEN D, LI YQ. Raman sorting and identification of single living micro-organisms with optical tweezers[J]. *Optics Letters*, 2005, 30(14): 1800-1802.
- [51] TÄUBER S, SCHMITZ J, BLÖBAUM L, FANTE N, STEINHOFF H, GRÜNBERGER A. How to perform a microfluidic cultivation experiment—a guideline to success[J]. *Biosensors*, 2021, 11(12): 485.
- [52] KONG LB, ZHANG PF, SETLOW P, LI YQ. Characterization of bacterial spore germination using integrated phase contrast microscopy, Raman spectroscopy, and optical tweezers[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(9): 3840-3847.
- [53] JING XY, GOU HL, GONG YH, SU XL, XU L, JI YT, SONG YZ, THOMPSON IP, XU J, HUANG WE. Raman-activated cell sorting and metagenomic sequencing revealing carbon-fixing bacteria in the ocean[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(6): 2241-2255.
- [54] ASLAN KAMIL M, FOURNEAUX C, YILMAZ A, STAVROS S, PARMENTIER R, PALDI A, GONIN-GIRAUD S, de MELLO AJ, GANDRILLON

- O. An image-guided microfluidic system for single-cell lineage tracking[J]. *PLoS One*, 2023, 18(8): e0288655.
- [55] LI JB, ZHANG DY, LI B, LUO CL, ZHANG G. Identifying the active phenanthrene degraders and characterizing their metabolic activities at the single-cell level by the combination of magnetic-nanoparticle-mediated isolation, stable-isotope probing, and Raman-activated cell sorting (MMI-SIP-RACS)[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(4): 2289-2299.
- [56] LI HZ, YANG K, LIAO H, LASSEN SB, SU JQ, ZHANG X, CUI L, ZHU YG. Active antibiotic resistome in soils unraveled by single-cell isotope probing and targeted metagenomics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(40): e2201473119.
- [57] CAO WW, CAI YF, BAO ZH, WANG SW, YAN XY, JIA ZJ. Methanotrophy alleviates nitrogen constraint of carbon turnover by rice root-associated microbiomes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 885087.
- [58] CUI L, YANG K, LI HZ, ZHANG H, SU JQ, PARASKEVAIDI M, MARTIN FL, REN B, ZHU YG. Functional single-cell approach to probing nitrogen-fixing bacteria in soil communities by resonance Raman spectroscopy with  $^{15}\text{N}_2$  labeling[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(8): 5082-5089.
- [59] SUN YF, LI SS, SI Y, NIU YF, YANG JZ, LIU YH, DONG L, ZHU PF, DAI J, YANG F. Dual-stable-isotope-probed Raman microspectroscopy reveals the metabolic dynamic of *Streptococcus mutans*[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2024, 304: 123318.
- [60] CUI L, YANG K, ZHOU GW, HUANG WE, ZHU YG. Surface-enhanced Raman spectroscopy combined with stable isotope probing to monitor nitrogen assimilation at both bulk and single-cell level[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(11): 5793-5800.
- [61] YAKUBOVSKAYA E, ZALIZNYAK T, MARTÍNEZ MARTÍNEZ J, TAYLOR GT. Tear down the fluorescent curtain: a new fluorescence suppression method for Raman microspectroscopic analyses[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 15785.
- [62] WEI D, CHEN S, LIU Q. Review of fluorescence suppression techniques in Raman spectroscopy[J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2015, 50(5): 387-406.
- [63] TAMAMIZU K, KUMAZAKI S. Spectral microscopic imaging of heterocysts and vegetative cells in two filamentous cyanobacteria based on spontaneous Raman scattering and photoluminescence by 976 nm excitation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2019, 1860(1): 78-88.
- [64] ISHIHARA J, TACHIKAWA M, MOCHIZUKI A, SAKO Y, IWASAKI H, MORITA S. Raman imaging of the diverse states of the filamentous cyanobacteria[C]//*Proc SPIE 8879, Nano-Bio Sensing, Imaging, and Spectroscopy*, 2013, 8879: 164-167.
- [65] SCHAIBLE GA, KOHTZ AJ, CLIFF J, HATZENPICHLER R. Correlative SIP-FISH-Raman-SEM-NanoSIMS links identity, morphology, biochemistry, and physiology of environmental microbes[J]. *ISME Communications*, 2022, 2: 52.
- [66] CUI L, XIN YH, YANG K, LI HZ, TAN FJ, ZHANG YL, LI XR, ZHU Z, YANG J, KAO SJ, REN B, ZHU YG, MUSAT F, MUSAT N. Live tracking metabolic networks and physiological responses within microbial assemblages at single-cell level[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Nexus*, 2023, 2(3): pgad006.
- [67] GÓMEZ-SJÖBERG R, LEYRAT AA, PIRONE DM, CHEN CS, QUAKE SR. Versatile, fully automated, microfluidic cell culture system[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(22): 8557-8563.
- [68] PAGUIRIGAN AL, BEEBE DJ. Microfluidics meet cell biology: bridging the gap by validation and application of microscale techniques for cell biological assays[J]. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 2008, 30(9): 811-821.
- [69] YAN CS, LUO S, CAO LQ, CHENG ZY, ZHANG H. Tensor product based 2-D correlation data preprocessing methods for Raman spectroscopy of Chinese handmade paper[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023, 302: 123033.
- [70] SZOSTAK R, MAZUREK S. Quantification of active ingredients in suppositories by FT-Raman spectroscopy[J]. *Drug Testing and Analysis*, 2013, 5(2): 126-129.
- [71] ROGGO Y, DEGARDIN K, MARGOT P. Identification of pharmaceutical tablets by Raman spectroscopy and chemometrics[J]. *Talanta*, 2010, 81(3): 988-995.