

FISH-FCM 方法检测酵母-细菌二元体系中微生物数量

张燕燕, 陈进军, 郑少奎*

(北京师范大学环境学院水环境模拟国家重点实验室, 北京 100875)

摘要:以废水生物处理系统和生物发酵系统出现的酵母-细菌二元体系作为研究对象,探讨了二元体系生物样品的最佳超声分散条件以及同时检测酵母和细菌数量时荧光原位杂交(FISH)-流式细胞术(FCM)技术的测量精度。染色-FCM检测表明:同时适用于混合酵母样品(酵母假菌丝)和混合细菌样品(活性污泥絮体)的最佳超声分散条件为100 W、60~90 s,但过强超声条件(120 s)对酵母 *Candida tropicalis* 纯培养物(或细菌 *Escherichia coli* 纯培养物)的超声粉碎效果完全不同于混合酵母样品(或混合细菌样品)。在此基础上,以 *C. tropicalis* 和 *E. coli* 分别作为酵母和细菌的模式微生物,采用双探针杂交的 FISH-FCM 技术检测了背景微生物(*C. tropicalis* 或 *E. coli*)浓度为 10^7 个/ml 时二元体系中目标微生物($10^2 \sim 10^7$ 个/ml)的数量。流式细胞仪能够明显区分噪音和二元体系中的酵母和细菌,因而一次进样时能够同时分析两种微生物数量,并且目标微生物浓度可以精确到 10^4 个/ml,此时微生物含量仅为 0.1%,其中细菌浓度甚至可以精确到 10^3 个/ml(相应含量仅为 0.01%)。然而,当二元体系中目标微生物浓度过低时($<10^4$ 个酵母/ml 或 $<10^4$ 个细菌/ml),背景微生物的存在会严重影响 FISH-FCM 技术的测量准确性。

关键词:荧光原位杂交;流式细胞术;微生物计数;酵母;细菌;超声

文章编号:1000-0933(2008)10-4849-07 中图分类号:Q143, Q145, Q93-33 文献标识码:A

Simultaneous enumeration of yeasts and bacteria in binary samples by FISH-FCM

ZHANG Yan-Yan, CHEN Jin-Jun, ZHENG Shao-Kui*

State Key Lab of Water Environment Simulation, School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(10): 4849 ~ 4855.

Abstract: In this study, the enumeration of yeast and bacterial cells was investigated using fluorescent in situ hybridization (FISH) in combination with flow cytometry method (FCM) after disruption of pseudomycelia or flocs by sonication. Firstly, mixed yeast samples with developed pseudomycelia and mixed bacteria samples, i. e. activated sludge flocs, were sonicated and investigated using the FCM following the staining with fluorescent dyes. The optimal sonication condition for both biological samples was 60–90 s at 100W. Excessive sonication treatment, i. e. for 120 s, had different effects on pure cultures of bacteria (or yeasts) and mixed samples of bacteria (or yeasts). Subsequently, the simultaneous enumeration of yeasts and bacteria in binary samples was investigated by FISH-FCM using two probes (PF2、EUB338). The binary samples were prepared using *Candida tropicalis* and *Escherichia coli* as model yeast and bacteria microorganisms, respectively, and contained 10^7 cells/ml of background microorganisms and varied concentrations of the target microorganisms ranging from 10^2 – 10^7 cells/ml. Flow cytometry could clearly distinguish yeasts, bacteria and background microorganisms, and one injection provided enumeration results for both target microorganisms simultaneously. FISH-FCM

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2006CB403306)

收稿日期:2007-06-03; 修订日期:2007-09-08

作者简介:张燕燕(1983–),女,山东荣成人,硕士生,主要从事水污染控制工程研究. E-mail:zyysara@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zshaokui@yahoo.com.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Basic Research Program of China(973) (No. 2006CB403306)

Received date: 2007-06-03; **Accepted date:** 2007-09-08

Biography: ZHANG Yan-Yan, Master candidate, mainly engaged in water pollution control engineering. E-mail: zyysara@yahoo.com.cn

effectively measured concentrations of the target microorganisms as low as 10^4 cells/ml for yeasts and 10^3 cells/ml for bacteria, corresponding to 1% and 0.1%, respectively. However, at concentrations $< 10^4$ cells/ml for yeasts and $< 10^3$ cells/ml for bacteria, the target microorganisms could not be accurately enumerated due to the presence of background microorganisms in the binary sample.

Key Words: FISH; FCM; enumeration; yeast; bacteria; sonication

在废水生物处理系统和生物发酵系统中有时会出现酵母和细菌共存的现象(即酵母-细菌二元体系,简称二元体系),并可能造成生物工艺的失败^[1~4],因而快速简便地分析二元体系中酵母和细菌数量有助于生物工艺的及时监控^[5]。流式细胞术(FCM)能够分辨样品中微生物细胞的大小,利用这一特点,Malacrino 等^[6]采用 FCM 检测了二元体系中细菌和酵母的数量,但研究表明其测量结果与平板计数法有显著差异。目前许多研究者将荧光原位杂交技术(FISH)和 FCM 联合起来检测不同细菌样品中特定细菌的数量,获得了较好的计数效果^[7~11]。同样,两种技术的联合应用也有可能提高二元体系酵母和细菌数量检测的选择性和精度,然而,尽管在许多酵母定性观察研究中已采用 FISH 技术^[12~14],在酵母样品计数时也已采用了 FCM 技术^[6,15],但采用 FISH-FCM 联合检测酵母数量的报道目前尚未见到,采用 FISH-FCM 检测二元体系中酵母和细菌数量的报道则更为鲜见。本文探讨了二元体系的最佳超声分散条件以及同时检测二元体系中酵母和细菌数量时 FISH-FCM 技术的测量精度。

1 实验方法

1.1 材料

1.1.1 微生物样品

本文中两种实际微生物样品分别取自不同污水处理系统,其中活性污泥样品取自北京高碑店污水处理厂 A²O 反应池,而假菌丝极为发达的酵母样品(文中称之为酵母假菌丝样品)取自本实验室高浓度有机废水酵母处理连续小试试验装置。此外,本研究还使用了两种纯种微生物,其中大肠杆菌(*E. coli*)取自北京师范大学生命科学学院,而热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 取自中国科学院微生物研究所,这两种微生物均呈单细胞状态,这两种微生物经无菌培养后得到的纯培养物经离心后用于后续试验研究。上述样品中 *C. tropicalis* 和酵母假菌丝样品的显微照片已在其它论文中刊出^[16]。

1.1.2 核酸染料与寡核苷酸探针

在考察超声预处理对酵母和细菌数量的影响时,本研究在固定细菌和酵母染色过程中采用核酸荧光染料 SYTOX green(Molecule probe, Invitrogen, USA)。在采用 FISH-FCM 分析方法同时检测酵母-细菌二元体系中酵母和细菌数量时,本文采用的细菌通用探针为 EUB338^[17],探针核苷酸序列为 5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3',5' 用荧光染料 Cy5 修饰(激发波长 649 nm,最大发射波长 670 nm,荧光颜色为紫色);通用酵母探针为 PF2^[18],探针的核苷酸序列为 5'-CTC TGG CTT CAC CCT ATT C-3',5' 用荧光染料 Cy3 修饰(激发波长 550 nm,最大发射波长 570 nm,荧光颜色为红色)。

1.2 微生物样品固定

将离心后微生物样品与 4% 的多聚甲醛溶液混合,在 4℃ 条件下避光固定 4 h,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.2)离心洗涤 3 次,用重量比例 w(PBS):w(乙醇) = 1:1 液稀释至 $10^8 \sim 10^9$ 个/ml,放置于 -20℃ 下备用。

1.3 荧光原位杂交过程

向 92.5 μ l 已预热至 46℃ 的杂交缓冲液(0.9 mol/L NaCl, 0.01% SDS, 20 mmol/L Tris-HCl, 20% 甲酰胺, pH 7.2)中依次加入 5 μ l 已固定的微生物样品和 2.5 μ l 浓度为 100 ng/ μ l 的探针(EUB338 或 PF2),在 46℃ 恒温下杂交 3 h。将杂交后的微生物样品离心、洗涤 20min(洗涤液的成分为 0.01% SDS, 20 mmol/L Tris -

HCl, 148 mmol/L NaCl, 预热至 46℃) 后备用。

1.4 流式细胞仪计数

本研究中流式细胞仪(FACSCalibur, BD, USA) 内含 488 nm 氩离子激光器和 635 nm 红色二极管激发器。对于 SYTOX 染料与核酸结合所发出的荧光同时使用 FL1 通道(515 ~ 545 nm) 和 FL2 通道(564 ~ 606 nm) 检测, 对于探针上标记的 Cy3 和 Cy5 发出的荧光, 通过 FL2 通道(564 ~ 606 nm) 和 FL4 通道(653 ~ 667 nm) 来检测, 并测量前向散射光(FSC-H) 和侧向散射光(SSC-H)。将已杂交或染色处理的微生物样品加入绝对计数管中(TruCount tube, BD, USA) 并送入流式细胞仪, 根据 CellQuest 软件分析结果即可计算出样品中微生物浓度。

1.5 微生物样品超声预处理研究

本研究首先考察了活性污泥絮体和酵母假菌丝样品的超声预处理特征, 在此基础上, 以 *C. tropicalis* 和 *E. coli* 作为酵母和细菌的模式微生物分别考察了超声预处理对微生物细胞的粉碎作用。操作过程为: 取上述已固定样品 0.2 ml, 用 PBS 溶液(预先采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤) 稀释至 20 ml(约 10^7 个/ml), 将活性污泥和酵母假菌丝体样品在超声细胞仪(VCX105, Sonics, USA) 100 W 超声功率下分别处理 15、30、45、60、75、90、105、120、135 s(每 15 s 一个循环), 随后将 *C. tropicalis* 和 *E. coli* 样品在同样条件下分别处理 90、120 s(每 15 s 一个循环), 超声处理过程均在冰上进行。在经超声处理后的微生物样品中分别加入核酸荧光染料 SYTOX green 染色 10 min 以上, 然后采用流式细胞仪分析不同微生物样品中细菌和酵母的数量。测定结果差异的显著性采用 SPSS 软件统计分析数据。

1.6 FISH-FCM 同时检测不同浓度的细菌和酵母

本研究以 *C. tropicalis* 和 *E. coli* 作为酵母和细菌的模式微生物分别考察了酵母-细菌二元体系中酵母(或细菌)浓度为 10^7 个/ml 时对细菌(或酵母)(浓度为 $10^2 \sim 10^7$ 个/ml) 数量检测的影响。操作过程为: 取已分别荧光原位杂交并且离心洗涤的 *C. tropicalis* (*E. coli*) 样品制成 10^8 个/ml 的酵母(细菌) 悬液, 并通过流式细胞仪准确测定微生物数量, 用作后续研究的母液: (1) 采用梯度稀释法将酵母(细菌) 母液分别稀释至 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 个/ml; (2) 在含有 3.2 ml $1 \times$ PBS 溶液的不同样品管中分别加入 0.4 ml 酵母(或细菌) 母液及其稀释液(10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3), 另外再向各管中加入另一种微生物母液 0.4 ml, 混合均匀, 此时不同样品管中细菌(或酵母) 的最终数量均为 10^7 个/ml, 而另一种微生物酵母(或细菌) 的最终浓度中分别为 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 个/ml, 呈梯度分布。根据流式细胞仪准确测定的母液微生物数量通过计算可以推算出不同样品管梯度稀释液中酵母和细菌的理论浓度(文中称之为理论浓度)。同时通过流式细胞仪测定不同梯度稀释液中酵母或细菌浓度(测定浓度)。

2 结果与分析

2.1 酵母-细菌二元体系超声分散

流式细胞仪往往会把成团细胞误计为单个生物体^[19], 因而采用流式细胞仪检测微生物样品数量时往往需要采用预处理, 将微生物样品分散成单个微生物细胞然后再进行计数。超声分散是目前应用最广泛的微生物絮体分散技术^[19~23], 但在酵母假菌丝分散预处理方面的应用则较为少见。由于过强的超声条件会粉碎微生物细胞^[24], 并且由于 FCM 无法计量这些破碎细胞而造成计数误差, 因而目前关于活性污泥絮体的超声分散研究往往以细胞计数值达到最大值时的超声条件为推荐处理条件^[21]。对于酵母-细菌二元体系而言, 超声分散应同时满足两个方面的要求: 即将活性污泥絮体分散成单细胞的同时将酵母假菌丝断裂成单细胞。本文首先分别探讨混合酵母样品(酵母假菌丝) 和混合细菌样品(活性污泥絮体) 的超声分散效果, 以确定适用于酵母-细菌二元体系的超声分散条件, 在此基础上考察了过强的超声分散条件对酵母 *C. tropicalis* 和细菌 *E. coli* 纯培养物的粉碎效果。

本文在超声分散研究中采用染色-FCM 作为微生物计数方法, 所用的绿色荧光复染剂 SYTOX green 能够通过固定微生物的细胞膜与 DNA 结合^[25], 染色后在流式细胞仪 FL1 和 FL2 通道形成很强的发射光(激发波长 504 nm, 最大发射波长 523 nm)。在 FL1 ~ FL2 双通道散点图内对目的细胞进行圈选后混合酵母样品和混

合细菌样品的显示区域如图 1 所示。由图 1 可以看出,染色后的细菌(bacteria)或酵母(yeast)都能够发出强烈荧光,并与荧光微球(beads)、噪音明显分开。

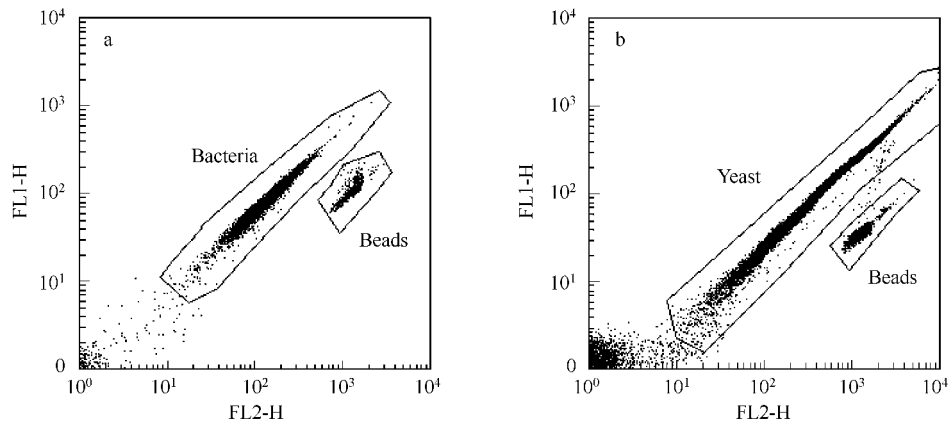


图 1 SYTOX green 染色后微生物的双通道散点图(图 a 为细菌 FC 图,图 b 为酵母 FC 图)

Fig. 1 Flow cytometric dot plot following staining by SYTOX green (FL2 vs. FL1 channel): (a) bacteria and (b) yeasts

2.1.1 酵母假丝样品和活性污泥絮体样品的超声分散

在不同超声处理时间下,酵母假菌丝样品和活性污泥絮体样品细胞计数结果见图 2 和图 3 所示。由图 2 可以看出,在超声时间为 60 s 时,酵母假菌丝样品的细胞浓度达到最大值,随后进一步增加超声时间对细胞浓度影响不大。而由图 3 可以看出,经过 45 s 超声分散处理,活性污泥絮体样品的细胞浓度达到最大值,在 60~90 s 之间细胞浓度变化幅度较小,超声分散时间超过 90 s 时由于细胞被粉碎,细胞浓度开始下降。Falcioni 等^[21]的试验结果也认为 90 s 超声处理能获得最佳的活性污泥分散效果。综合两种微生物样品的超声分散效果,可采用 100W、60~90s 作为酵母-细菌二元体系的超声分散条件。

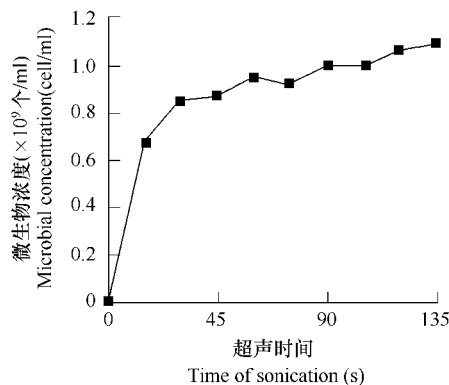


图 2 不同超声时间对酵母假菌丝计数的影响

Fig. 2 Effect of sonication time on enumeration performance of FCM for filamentous yeasts

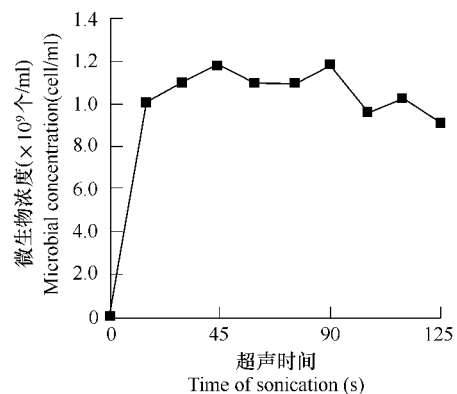


图 3 不同超声时间对活性污泥计数的影响

Fig. 3 Effect of sonication time on enumeration performance of FCM for activated sludge

2.1.2 过强超声条件下酵母和细菌纯培养物的超声粉碎作用

上述研究表明,在 90 s 以上超声分散条件下混合细菌样品表现出超声粉碎效果,而混合酵母样品计数结果则无实质性变化。为了考察混合酵母(或细菌)样品超声粉碎过程的微生态含义,以 90 s 超声分散处理为对照,本文进一步考察了 120 s 超声分散条件下酵母 *C. tropicalis* 和细菌 *E. coli* 纯培养物的超声粉碎效果,其流式细胞术计数 3 次测量结果见表 1。与 90 s 超声分散效果相比,120s 超声分散处理后 *C. tropicalis* 细胞浓度显著减少($F=54.260, P=0.002 < 0.05$),而 *E. coli* 细胞浓度则没有明显差异($F=0.430, P=0.584 > 0.05$),

对比混合酵母(或细菌)培养物与酵母(或细菌)纯培养物在 90 s 和 120 s 超声分散条件下的超声粉碎效果可以看出,过强超声条件(120 s)对酵母(或细菌)纯培养物的超声粉碎效果均不同于混合酵母(或细菌)样品:对混合酵母无影响但严重影响酵母纯培养物计数结果,严重影响混合细菌计数结果但对细菌纯培养物无影响。许多超声分散研究均发现过强的超声条件会粉碎微生物细胞^[24],而本文的研究结果则表明过强的超声条件可能只是引起某些种类微生物的细胞粉碎,就微生态层面而言,超声粉碎对于不同种类的微生物而言并不具有普遍性。由此可见,作为生物样品分散的主要手段,超声分散预处理仍存在明显不足。因此,提高 FISH-FCM 检测精度仍需进一步完善生物样品分散预处理技术。

表 1 过强超声分散条件下 *C. tropicalis* 和 *E. coli* 纯培养物的 FCM 计数效果

Table 1 Effect of excessive sonication treatment on enumeration of pure cultures of *C. tropicalis* and *E. coli* by FCM

超声时间(s) Time of sonication	<i>C. tropicalis</i> (cell/ml)	相对标准偏差 Relative standard deviation	<i>E. coli</i> (cell/ml)	相对标准偏差 Relative standard deviation
90	2.02×10^8	2.31%	5.19×10^9	2.85%
90	2.00×10^8		4.94×10^9	
90	1.94×10^8		5.20×10^9	
120	1.63×10^8	4.75%	5.04×10^9	2.71%
120	1.54×10^8		5.22×10^9	
120	1.69×10^8		5.31×10^9	

2.2 细菌和酵母二元体系的 FISH-FCM 分析

为了尽可能获得准确的背景微生物浓度和系列目标微生物浓度,从而考察酵母-细菌二元体系中两类微生物的数量和比例对 FISH-FCM 检测精度的影响,本文在配制不同浓度和比例的二元体系时采用 *C. tropicalis* 和 *E. coli* 纯培养物作为细菌和酵母的模式微生物,这主要因为这两种微生物是废水生物处理和生物技术领域常见的酵母和细菌类型,而且无论是通用探针杂交特性还是细胞大小等都具有普遍代表性。

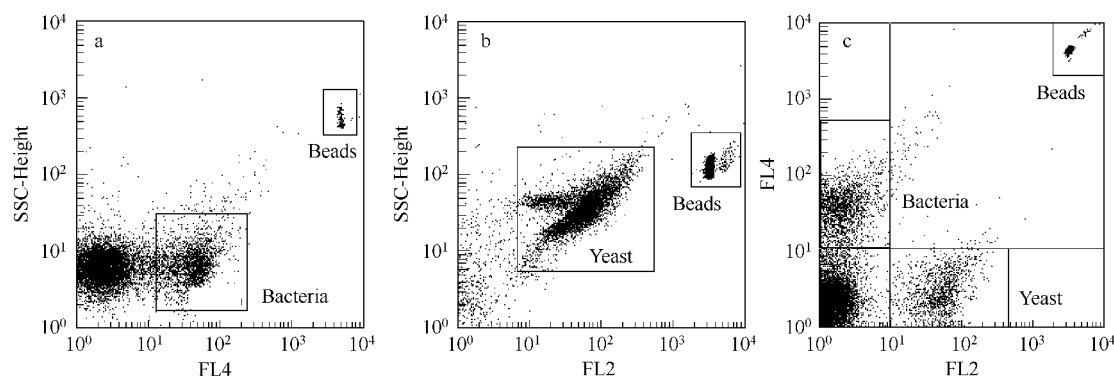


图 4 FISH 杂交后微生物散点图

Fig. 4 Flow cytometric dot plot following fluorescent in situ hybridization

图 a 为细菌单一体系的 FL4-SSC 散点图;图 b 为酵母单一体系的 FL2-SSC 散点图,图 c 为二元体系的 FL2-FL4 双通道散点图 (a) bacteria (FL4 vs. SSC channel); (b) yeasts (FL2 vs. SSC channel); (c) binary sample (FL2 vs. FL4 channel)

图 4 是与荧光探针杂交后细菌(图 4a)、酵母(图 4b)单一体系以及酵母-细菌(图 4c)二元体系的流式散点图。由图 4a 可以看出,在 FL4-SSC 中细菌和噪音可以明显分开,在图 4b 中酵母也清晰地聚成一团。图 4c 是细菌和酵母共存时的 FL2 ~ FL4 散点图,图中可以看出,由于细菌探针 EUB338 所带荧光染料 Cy5 在 FL4 通道有发射光,细菌集中在 UL(左上)区域;酵母探针 PF2 所带荧光染料 Cy3 在 FL2 通道有发射光,酵母集中在 LR(右下)区域,噪音没有荧光,集中在 LL(左下)区,计数微球由于有在两个通道都有强荧光所以出现在 UR(右上)区,四者之间能够较好地分离开。这表明采用两种荧光探针 PF2、EUB338 同时分别杂交酵母-细菌二元体系中酵母、细菌时,流式细胞仪能够明显区分酵母、细菌和噪音,并同时得到两种微生物的计数结果,这

些结果保证了流式细胞仪对待测细菌或酵母单一样品或二元体系的精确计数。

以单一体系和二元体系的测定微生物数为 X 轴、计算的理论微生物数为 Y 轴,进行对数坐标分析。坐标图上测量比较准确的点应位于 45° 线上,偏离 45° 线说明测量结果与理论值相比有偏差,测量不准确。如果流式细胞仪的测定结果不受二元体系的影响,坐标图中一元和二元体系的点应该基本重合,如果有影响,则会分离。

从图 5 可以看出,无论是单一的酵母体系还是在细菌浓度保持为 10^7 个/ml 的二元混合体系,当酵母浓度分别为 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 个/ml 时两者的酵母计数结果几乎完全相同,表明细菌浓度处于一定浓度时采用 FISH-FCM 检测酵母-细菌二元体系中酵母浓度时检测结果不受细菌存在的影响而仅与酵母浓度有关;而当酵母浓度为 10^2 或 10^3 个/ml 时,细菌的存在对酵母-细菌二元体系中酵母的计数结果影响较大,两种计数结果之间存在明显差异,并且酵母浓度越低两者偏差越大。对于 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 个/ml 的酵母浓度,测定值和理论值都大体相当(点位于 45° 线上),说明此时 FISH-FCM 计数能得到比较精确的结果;而当细胞浓度为 10^2 或 10^3 个/ml 时,单一体系计数结果会有偏差(偏离了 45° 线),而混合体系的计数结果则完全背离真实值。

从图 6 可以看出,无论是单一的细菌体系还是在酵母浓度保持为 10^7 个/ml 的二元混合体系,当细菌浓度分别为 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 个/ml 时两者的细菌计数结果几乎完全相同,表明酵母浓度处于一定浓度时采用 FISH-FCM 检测酵母-细菌二元体系中细菌浓度时检测结果不受酵母存在的影响而仅与细菌浓度有关;而当细菌浓度为 10^2 个/ml 时,酵母的存在对酵母-细菌二元体系中细菌的计数结果影响较大,两种计数结果之间存在明显差异。对于 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 个/ml 的细菌浓度,测定值和理论值都大体相当(点位于 45° 线上),说明此时 FISH-FCM 计数都能得到比较精确的结果,当细胞浓度为 10^3 个/ml 时,单一体系和混合体系的计数结果都略有偏差(偏离了 45° 线)。当细胞浓度为 10^2 个/ml 时,混合体系比单一体系更加偏离真实值。

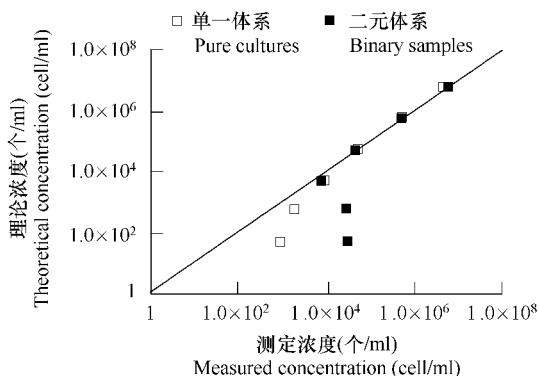


图 5 单一体系和二元体系中酵母数量测定

Fig. 5 Enumeration of yeasts in pure cultures and binary samples

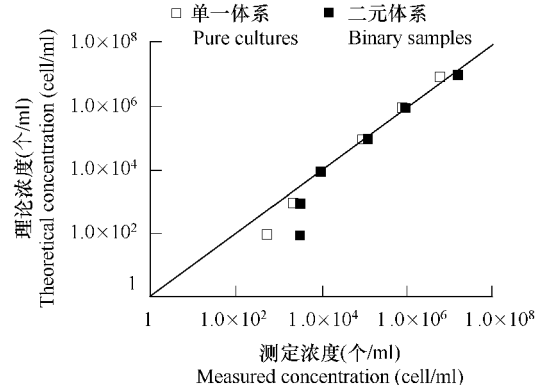


图 6 单一体系和二元体系中细菌数量测定

Fig. 6 Enumeration of bacteria in pure cultures and binary samples

从以上结果可以看出,当二元体系中背景微生物浓度为 10^7 个/ml 时,目标微生物浓度的 FISH-FCM 检测可以精确到 10^4 个/ml,即微生物含量仅为 0.1%,其中当酵母浓度为 10^7 个/ml 时细菌浓度计数甚至可以精确到 10^3 个/ml,即细菌含量仅为 0.1%。在其它 FISH-FCM 研究中,Joachimsthal 等^[9]采用 FISH-FCM 检测出压舱水中 Eubacteria、Enterobacteria、Vibrio spp.、E. coli 分别占总菌比例为 0.67%~39.55%、0~2.46%、0.18%~35.82% 和 0~2.46%;Tay 等^[10]发现好氧颗粒污泥中厌氧细菌占细菌总数 0.56%。这些研究表明 FISH-FCM 可以用来检测极低含量的目标微生物,无论在二元体系还是混合细菌样品中。当二元体系中目标微生物的浓度过低时($<10^4$ 个酵母/ml 或 $<10^4$ 个细菌/ml),背景微生物的存在会严重影响计数结果的精确性。由此可见,二元体系中目标微生物的精确计数主要取决于其自身的浓度水平,当其浓度过低时受另一种微生物存在的影响较大。

3 结论

(1) 对于活性污泥絮体样品来说,最佳超声条件是 45~90 s,超过 90 s 则对细胞产生破坏作用,而酵母假

菌丝样品完全分散成单细胞则需要超过 60 s 的超声分散时间。过强超声条件下,混合酵母(或细菌)样品与酵母(或细菌)纯培养物的超声粉碎效果显著不同,超声分散作用实质上是一种综合效果。

(2) 双探针杂交的 FISH-FCM 技术能使酵母、细菌和噪音很好地分开。无论是单一体系还是二元混合体系, FISH-FCM 都能精确计量 $10^4 \sim 10^7$ 个/ml 浓度的酵母或细菌,但目标微生物细胞浓度过低时二元体系的存在增加了微生物计数的难度。

References:

- [1] Sakamoto K, Konings W N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 89(2 3):105—124.
- [2] Sun Y H, Lu W Z, Gao J, *et al.* Treatment of high-strength oil-containing wastewater by mixed yeast cultures under different pH. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2006, 7(9):94—98.
- [3] Malandra L, Wolfaardt G, Zietsman A, *et al.* Microbiology of a biological contactor for winery wastewater treatment. *Water Research*, 2003, 37(17):4125—4134.
- [4] Petruccioli M, Duarte J C, Eusebio A, *et al.* Aerobic treatment of winery wastewater using a jet-loop activated sludge reactor. *Process Biochemistry*, 2002, 37(8):821—829.
- [5] Zhu L J, Zheng F Y, Li Q, *et al.* Methods Review for Beer Spoilage Detection. *Food Science*, 2007, 28(1):360—366.
- [6] Malacrino P, Zapparoli G, Torriani S, *et al.* Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45:127—134.
- [7] Vaahtovuori J, Korkeamäki M, Munukka E, *et al.* Quantification of bacteria in human feces using 16S rRNA-hybridization, DNA-staining and flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 63(3):276—286.
- [8] Hartmann H, Stender H, Schäfer A, *et al.* Rapid Identification of *Staphylococcus aureus* in Blood Cultures by a Combination of Fluorescence In Situ Hybridization Using Peptide Nucleic Acid Probes and Flow Cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(9):4855—4857.
- [9] Joachimsthal E L, Ivanov V, Tay S T, *et al.* Bacteriological examination of ballast water in Singapore Harbour by flow cytometry with FISH. *Marine Pollution Bulletin*, 2004, 49(4):334—343.
- [10] Tay S T L, Ivanov V, Yi S, *et al.* Presence of anaerobic bacteroides in aerobically grown microbial granules. *Microbial Ecology*, 2002, 44(3):278—285.
- [11] Ivanov V N, Wang J Y, Stabnikova O V, *et al.* Microbiological monitoring in the biodegradation of sewage sludge and food waste. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96(4):641—647.
- [12] Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, *et al.* Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Fluorescent In Situ Hybridization with Peptide Nucleic Acid Probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(11):4138—4141.
- [13] Rigby S, Procop G W, Haase G, *et al.* Fluorescence In Situ Hybridization with Peptide Nucleic Acid Probes for Rapid Identification of *Candida albicans* Directly from Blood Culture Bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(6):2182—2186.
- [14] Xufre A, Albergaria H, Inacio J, *et al.* Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 108:376—384.
- [15] Deere D, Shen J, Vesey G, *et al.* Flow Cytometry and Cell Sorting for Yeast Viability Assessment and Cell Selection. *YEAST*, 1998, 14:147—160.
- [16] Zhang Y Y, Zheng S K, Yang Z F. Yeast Microaerobic Treatment of High-strength Organic Wastewater. *Environmental Science and Technology*, 2006, 29(11):96—98.
- [17] Amann R I, Binder B J, Olson R J, *et al.* Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56(6):1919—1925.
- [18] Kempf VA J, Trebesius K, Autenrieth I B. Fluorescent In Situ Hybridization Allows Rapid Identification of Microorganisms in Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(2):830—838.
- [19] Laplace B C, Hahne K, Hunger W, *et al.* Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries. *Biol. Cell*, 1993, 78:123—128.
- [20] Biegala I C, Not F, Vaultot D, *et al.* Quantitative assessment of picoeukaryotes in the natural environment by using taxon-specific oligonucleotide probes in association with tyramide signal amplification-fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(9):5519—5529.
- [21] Falcioni T, Manti A, Boi P, *et al.* Comparison of Disruption Procedures for Enumeration of Activated Sludge Floc Bacteria by Flow Cytometry. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2006, 70(3):149—153.
- [22] Papadimitriou K, Pratsinis H, Nebe-von-Caron G, *et al.* Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 111(3):197—205.
- [23] Braga P C, Bovio C, Culici M, *et al.* Flow Cytometric Assessment of Susceptibilities of *Streptococcus pyogenes* to Erythromycin and Rokitamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(1):408—412.
- [24] Nebe-von-Caron G, Stephens P J, Hewitt C J, *et al.* Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 42:97—114.
- [25] Lebaron P, Catala P, Parthuisot N. Effectiveness of SYTOX Green Stain for Bacterial Viability Assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7):2697—2700.

参考文献:

- [2] 孙玉红,吕文洲,高静,等.不同 pH 条件下酵母菌处理高含油废水的研究. *环境污染治理技术与设备*, 2006, 7(9):94—98.
- [5] 朱林江,郑飞云,李崎,等.啤酒腐败菌的检测方法. *食品科学*, 2007, 28(1):360—366.
- [16] 张燕燕,郑少奎,杨志峰.高浓度有机废水酵母菌低氧处理技术初探. *环境科学与技术*, 2006, 29(11):96—98.