

流式细胞术在细菌快速检测中的应用

刘新星 霍转转 云慧 杨英杰*

(中南大学 资源加工与生物工程学院 生物冶金教育部重点实验室 湖南 长沙 410083)

摘要: 流式细胞仪(Flow cytometer)是集应用流体学、光学、电子学、生物学、免疫学等多门学科和技术于一体的新型高科技仪器。它的核心技术是流式细胞术(Flow cytometry, FCM), 该技术是利用流式细胞仪, 使单个细胞或其他微小生物粒子处于快速直线流动状态, 且逐个通过光束, 从而对单个细胞或微粒进行多参数(数量、大小、核酸含量、细胞活性、特定菌群或物种等)定量分析和分选的检测技术, 具有快速、灵敏、精确以及便于操作等突出优点。本文简要介绍流式细胞仪的原理, 并论述流式细胞技术在实验室研究、工业生产、临床诊断、环境评估等领域的细菌快速检测应用。

关键词: 流式细胞术, 工作原理, 细菌, 快速检测, 应用

Application of flow cytometry to rapid detection of bacteria

LIU Xin-Xing HUO Zhuan-Zhuan YUN Hui YANG Ying-Jie*

(Key Laboratory of Biometallurgy of Ministry of Education, School of Mineral Processing and Bioengineering, Centre South University, Changsha, Hunan 410083, China)

Abstract: Flow cytometer, an advanced instrument integrating fluidics, optics, electronics, biology, immunology, etc., measures cells in suspension that flow in single-file through laser beam. Flow cytometry (FCM), as the core of flow cytometer, is a multidisciplinary technique for analysing and sorting cells or other particles. FCM can provide a multitude of information at the single-cell level, including (but not limited to) total counts, size measurements, nucleic acid content, cell viability and activity, and detection of specific bacterial groups or species. The main advantage of FCM is that it is fast, sensitive, accurate and easy to perform. Here, we briefly review the basic principle of flow cytometer, focusing on its recent applications to rapid detection of bacteria in laboratory research, industrial biotechnology, clinical diagnosis and environment assessment.

Keywords: Flow cytometry (FCM), Basic principle, Bacteria, Rapid detection, Application

流式细胞技术从 20 世纪 70 年代创建以来, 发展迅猛, 最初主要应用于科学研究和临床检验, 在微生物学方面的应用则相对较晚, 主要原因是微生物细胞或粒子较小, 所得光信号相对较弱, 不便于

检测。在国外, 流式细胞术(Flow cytometry, FCM)已在细菌常规工作中得到广泛的应用^[1], 而在国内起步较晚。

随着近些年来光学的发展与进步、荧光染料的

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2010CB630901)

*通讯作者: Tel: 86-731-8876697; ✉: x-mine@mail.csu.edu.cn

收稿日期: 2013-01-17; 接受日期: 2013-04-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

丰富和改良以及流式细胞仪本身的不断完善^[2-5],如今流式细胞术已经成为微生物学研究中一种必不可少的手段,在微生物检测中扮演着越来越重要的角色。微生物学,尤其是细菌学,当前面临着一些问题,特别是需要对细菌逐个进行快速、多参数精确测量,流式细胞术很适合解决此类问题。目前,已有很多此方面的报道^[6-8],本文将从实验室研究、临床诊断、工业检测以及环境领域等4个方面介绍流式细胞术在细菌检测中的应用。

1 流式细胞仪工作原理^[9-11]

图1为流式细胞仪基本结构。它主要由液流系统、光学系统、信号收集与转换系统、分析系统和细胞分选系统5个部分组成。

1.1 分析

1.1.1 单菌制备:首先将待测标本处理成单细胞或单微粒悬液进行荧光染色后,在一定气压下将待测样品压入流动室,不含细胞或微粒的缓冲液(又称鞘液)在高压下从鞘液管喷出,鞘液管入口方向与待测细胞或微粒流成一定角度,使鞘液包绕着细胞或微粒高速流动,形成一个圆形的流束(即鞘流),待测粒子在鞘液的包裹下单行排列,逐个依次通过流式细胞仪的检测区域。

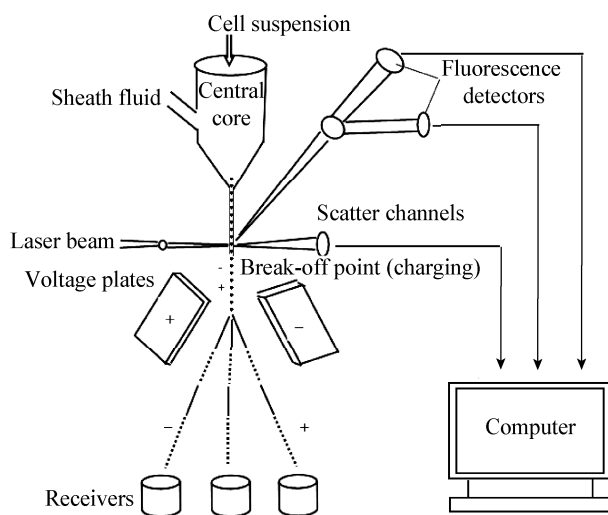


图1 流式细胞仪示意图

Figure 1 Diagram of flow cytometer

1.1.2 产生检测信号:以激光为激发光源,经过聚焦整形后的光束垂直照射到样品流上,被荧光染色的细胞在激光束的照射下产生散射光和激发荧光。这两种信号同时被前向光电二极管和90°方向的光电倍增管(PMT)接收。在前向小角度检测的光散射信号,称为前向散射光(Forward scatter, FSC),其信号反映细胞的大小;90°散射光又称侧向散射光(Side scatter, SSC),是指与激光束-液流平面垂直的散射光,其信号强度可反映胞内粒度情况及胞内部分结构的信息。荧光信号的接收方向与激光束垂直,经过一系列双色性反射镜和带通滤光片的分离,形成多个不同波长的荧光信号。这些荧光信号的强度代表所测细胞膜表面抗原的数目或其细胞内、核内所标记物质的浓度等。可见流式细胞仪可以同时进行检测。

1.1.3 信号转换和处理:荧光信号和散射光信号经光电探测器和光电倍增管接收后转换成放大电信号,再通过模/数转换器将连续的电信号转换为可被计算机识别的数字信号,输入计算机进行处理,应用不同的分析软件可分析样品的各种参数,最后以散点图或直方图或三维图等形式显示出来。

1.2 分选

1.2.1 形成液滴:把需分选液滴形成的信号加于高频电晶体(在流动室的喷口上配有一个超高频电晶体,充电后振动,使喷出的液流断裂为均匀液滴,待测定细胞分散在这些液滴之中)上,使之产生机械振动,流动室即随之振动,使液柱断裂成一连串均匀的液滴。

1.2.2 液滴充电:一部分液滴中包有细胞,而细胞性质在进入液滴之前已被测定,如果其特征与被选定进行分选的细胞特征相符,则仪器在这个被选定的细胞刚形成液滴时给整个液柱充以指定的电荷,当被选定的细胞形成液滴时已带有特定电荷,而未被选定细胞形成的液滴和不包含细胞的空白液滴不被充电。

1.2.3 液滴偏转:带有电荷的液滴向下落入偏转板的高压静电场,按照所带电荷符号向左或向右偏

转,落入指定的收集器内,完成分类收集的目的。对分选出的细胞可以进行深入研究。

2 FCM 在实验室研究中的细菌检测应用

细菌研究中一项最基本的需要是菌体计数,常规计数方法主要是国家标准推荐的平板法^[12]和通用的显微技术,它们最大的缺点分别是误差大和耗时长,且平板法只能计数活菌。

FCM 可以同时克服传统方法耗时长和误差大的缺点,快速得到细菌总数,若检测的是一定体积样品中的菌数,即得知菌浓度^[13],并可区分活菌和死菌,获得活菌百分比。谢小军等^[14]以碘化丙啶(PI)为荧光染料,用流式细胞术检测被链球菌 α -34 抑制而死亡的化脓性链球菌 32309-2 数量,并计数了活菌数目,快速便捷且结果可靠。另外,根据前向角散射光(FSC)与细胞直径密切相关,可通过 FSC 获得菌体平均大小或粒度分布情况,需注意,虽然 FSC 是固有参数,但在具体操作时,一般要进行荧光素处理,不仅可以增加待测菌体的敏感度和精确性,同时避免了样品中其他细小微粒的干扰(因为大小相近)。

FCM 也可用于细菌鉴定。流式细胞仪检测的荧光强度与 DNA 片段大小成比例, Kim 等^[15]依据基因组 DNA 的限制性片段指纹图谱鉴定革兰氏阳性菌——球芽孢杆菌(*Bacillus globigii*)和两种革兰氏阴性菌——大肠杆菌(*Escherichia coli*)和草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*),结果表明,FCM 得到的 DNA 大小与脉冲场凝胶电泳(PFGE)结果具有高度一致性,而 FCM 所需纯化 DNA 样品量为 pg 级,且只需 10 min 对数据进行处理和分析。可见,该技术有高度灵敏和快速的特点,是一种极具前景的细菌鉴定手段。

细菌群体的分化是很普遍的现象,即使实验室“纯培养”也是由多种生理生化性质不同的小亚群组成,FCM 可对细菌的生理异质性进行分析。如 Andrew Want 等^[16]采用 FCM 检测出至少 4 种生理异质性蜡样芽孢杆菌亚群,并将其分类后进行固体平板培养,证实其不同。该技术不仅可以同时从表

型上和基因水平上进行异质性检测,而且有利于检出更多异质性菌体,并从中筛选出优势菌株,更全面、透彻地解释细菌的高度适应性。

FCM 在细菌诱导突变株选育中也有应用。Valdivia 等^[17]根据荧光信号的不同,对鼠伤寒沙门氏菌基因启动子的酸诱导突变株进行了筛选,得到 8 个突变株,经过分析鉴定,它们的启动子与野生菌具有高度同源性。可以预言,只要能找到合适的荧光探针,就能利用该技术获得特定位点的突变株,在菌种改良方面有很大意义。

此外, Lingling Yang 等^[6]首次应用高灵敏度流式细胞仪检测、计数自体荧光细菌,并分析 1 min 内通过的细菌获得自体荧光的强度分布情况,这种检测微弱自体荧光的方法对研究单个菌体内低水平基因表达和低丰度生物分子具有重要意义。

3 FCM 在工业生产中的细菌检测应用

工业产品中的微生物是影响产品质量、风味、保质期及安全性的关键因素。国内外有关用流式细胞仪检测工业产品中细菌的报道很多,以下从 FCM 在菌体计数、活性判断、在线监测三方面的应用做一介绍。

目前,该技术已应用于检测液态加工产品中总菌数或特定菌群数,如 Gunasekera 等^[18]使用流式细胞仪在 1 h 内检测牛奶中污染的细菌数量,使用酶解法消除蛋白质类和脂质粒子,菌的检测下限浓度为 $<10^4$ 个/mL;刘道亮等^[19]用流式细胞技术快速检测了果汁中的细菌总数;Malacrino 等^[20]用流式细胞仪检测啤酒中乳酸菌数目,结果与平板计数法的相关系数为 $r=0.94$ 。这些研究表明,FCM 可以作为产品质量控制和菌群生长动态监测的重要手段,与传统方法高度一致,结果可靠,且具有快速、灵敏、便捷的优点。

工业生产中,有时需要判断菌体活性,确保生产效率。此时,运用 FCM 需选用膜非渗透性染料,如碘化丙啶(PI),它不能进入具有完整细胞膜的活细胞,当细胞死亡或细胞膜不完整时,PI 渗入细胞内嵌入 DNA 碱基对中并与之结合,在 488 nm

的激光激发下,在波长 660 nm 左右检测到红色荧光。因此,通过荧光信号的强弱或有无可知菌体活性的大小或有无,并且该方法可以检测低活性的细胞,如果使用传统的培养法或亚甲基蓝染色法检测低活性细胞,则误差较大。

产品的生产一般是一个连续的流水线过程,终产品是否合格依赖于各环节的质量保证,这就是实时在线监测的意义所在,科学家们应用 FCM 对此作了探索。Tobias Broger 等^[21]设计了一种低通量流式细胞术检测系统(Flow injection flow cytometry, FI-FCM),用于实时、在线监测生物反应器中菌体生长的整个变化过程,每 5 min 检测一次,并且对发酵液的稀释倍数高达 10 000 倍。通过与 3 种其他荧光检测方法比较,指出,虽然这 4 种荧光检测之间的相关性极高($R^2 \geq 0.97$),但只有流式细胞术可以从大量弱荧光信号的菌体中辨别出少量荧光信号强的菌体。他们还证明菌体培养过程中,个体之间异质性明显,因为菌群中菌体的信号分散在一个较宽的范围内,并设想从中选择高产量、稳定的菌株,为了验证该方法的可靠性,他们对 3 种菌进行了试验,其中包括大肠杆菌。

由上可知,该技术在产品检测和监测方面具有传统方法无法比拟的特点,有利于及时将合格产品投放到市场,促进生产效率的提高。

4 FCM 在临床细菌检测中的应用

流式细胞术最初是应用于哺乳类动物细胞的检测,在临床中的应用历史几乎是 FCM 的应用历史,目前该技术普遍应用于临床检测,样品范围由真核细胞拓展到原核生物,甚至更小的病毒。它灵敏、快速的特点,使病症的及时诊断成为可能,对患者的健康至关重要,最典型且最早的例子是菌血症的诊断^[22],在医学领域,FCM 起着举足轻重的作用,有极其广阔的应用前景。

关于临床细菌,药敏性和异质性很常见,且二者密切相关。应用 FCM 检测临床细菌始于药敏性

检测。Suller 等^[23]用 FCM 检测头孢他啶、氨苄青霉素和万古霉素这 3 种抗生素分别对绿脓杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的药敏性反应,结果发现,FCM 可以快速、灵敏地检测抗生素抗菌效应,并且利用细胞氧化活性染料 CTC 检测出几个不同的细胞亚群,因为不同的细菌亚群对抗生素的敏感性不同,从而直观地反映细胞异质性。付亮等^[24]对 49 株临床分离的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌同时用 NCCLS 推荐的确证试验和流式细胞术两种方法进行两种药物的敏感性检测,结果发现,流式细胞术与传统方法检测结果具有一致性,且更快速、客观、便于自动化,可用于联合药敏试验方面的研究。该技术可同时获得有关药敏性和异质性的相关信息,是一种有力的检测手段。

FCM 快速的优势在临床检测中显得尤为重要,因为快速诊断有利于及时治疗,特别对于急性病,直接关系生命健康与安全。Dilan Qin 等^[25]将结核分支杆菌用荧光二氧化硅纳米颗粒和荧光素 SYBR Green I 两种染料标记后,用流式细胞术检测,可检测菌浓度低至 $3.5 \times 10^3 - 3.0 \times 10^4$ 个/mL,比只用 FITC 染色的流式细胞术更灵敏,整个检测过程(包括样品的前处理时间)所需时间小于 2 h,并指出该方法可用于临床上其他病原菌的快速检测。Mansour 和他的同事^[22]应用 FCM 检测菌血症(菌感染浓度可能低至 10 个/mL)患者血液中大肠杆菌数,菌的检测下限浓度是 10-100 个/mL,且只需 2 h;如果用传统方法检测,直接进行显微计数显然是不可能的,必须经过 7 d 扩大培养才能得到结果。也有研究报道^[26],用流式细胞术检测卡介苗(BCG)疫苗的效能,在 4 h 内即可完成检测,而平板法需 4 个星期。由此可见,该技术效率极高。

另外,William 等^[27]用 ATYP-RPE 和 IgG-FITC 双色流式细胞术同时分辨出炭疽杆菌孢子和与之结合的抗原,证明流式细胞术是一种快速有效检测恶性炭疽杆菌孢子的方法。这说明,FCM 的临床细菌诊断范围不局限于一般菌体,还可以检测休眠

体,在其活化之前作出诊断,及早治疗。

5 FCM 在环境样品中的细菌检测应用

在环境样品检测中,平板法严重制约了微生物总菌数和多样性的深入研究,给检测结果带来较大误差。再者,传统方法如基因芯片^[28]虽具有高通量的特点,但操作繁琐。FCM 具有样品制备简单、可进行快速多参数数据采集、精确测定、可进行多元数据分析以及分选功能等优越性,自从 1993 年 Wagner 等^[29]利用该技术对活性污泥中微生物进行群落结构分析以来,该技术引起愈来愈多生态学家的关注,逐渐成为空气、土壤、水等环境中微生物学研究中的一重要工具。如 Lange Jeffrey 等^[30]用流式细胞仪结合荧光原位杂交技术检测实验室空气和猪谷仓空气中的微生物,用液化收集器取得样品后,经过荧光染料 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色后,FCM 可以从样品中的粉尘杂质中辨别出菌体并计数,获得细菌总数(包括死菌),而传统的平板计数法所得数目比 FCM 少 2 个数量级。

FCM 也可用于土壤样品检测。Jean Christophe 等^[31]对土壤样品中特定的微生物进行 FCM 的定性和定量检测,他们用溴化乙锭(标记细胞膜通透性增加的细胞)和与 16S rRNA 互补的荧光探针,并利用光散射参数限定菌体的大小,从天然土壤的微生物群落和粉尘碎片中区分出特定检测菌——絮凝剂产生菌。Amann 等^[32]和 Wallner 等^[33]也用此方法来分析混合菌群,鉴于环境样品中某些菌体量少,16S rRNA 荧光信号微弱,需要做信号的放大^[34]。

随着工业的发展,环境污染尤其水体污染日益严重,水质的快速、准确检测对人类健康和环境保护意义重大。Joachimsthal 等^[35]用 FCM 和 FISH 对新加坡港的压舱水进行了细菌总数、肠道菌数、弧菌数和大肠杆菌数的检测,结果发现不同取样点压舱水的实验结果之间存在较大差异,表明航运业的压舱水受多种因素的影响,水质状况较为复杂,FISH 和 FCM 结合可以为压舱水的污染状况提供大量信息。Yamaguchi 等^[36]使用 FCM 分别对未污

染和污染河水中细菌的呼吸活性和酯酶活性进行了检测,以荧光素 6-CFDA (6-羧基二乙酸酯)和 PI (碘化丙啶)作为细菌酯酶活性的指示剂^[37],以 CTC (5-氰基,2,3-二甲苯基氯化四唑)为细菌呼吸活性指示剂^[38],结果发现,菌体酯酶活性对污染状况更敏感,有酯酶活性的细菌比例与河水污染程度呈正相关,可以此作为评估环境水污染的指标。

除了细菌外,浮游生物也是造成水质破坏的一大因素,它们常可引起“水花”。所幸,FCM 也可用于浮游生物的检测。2011 年,Spizzichino 等^[39]首次应用改良的激光扫描流式细胞仪研究超微型、微型浮游生物——转基因聚球藻(*Synechococcus* sp.)和莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*),指出该方法适于研究浮游生物群落的组成和变化,可以作为“水花”形成早期的检测手段。2012 年,Quan Zhou 等^[40]利用流式细胞术对太湖湖底沉积物中的微胞藻属菌体计数,并对微胞藻聚集体进行了群落分析,表明 FCM 可以高效监测微胞藻属的群落变化,具有高度适用性。

由以上研究成果可知,该技术可用于各种水质检测和污染监控。

6 FCM 在趋磁细菌研究中指日可待的应用

1975 年美国科学家 Blakemore^[41]首次发现趋磁细菌,其体内合成独特的纳米磁性颗粒——磁小体,因此受到科学家们的日益关注,有关趋磁细菌及磁小体研究的文献大量涌现。本实验室也从浸矿微生物中自行分离得到 3 种趋磁细菌:氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)^[42-43]、嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*)^[44]和极端嗜酸氧化亚铁古菌(*Ferroplasma thermophilum*)^[45]。

目前,趋磁细菌的磁小体合成机理尚不清楚,研究遇到很多问题,其中一个瓶颈问题是磁小体合成量的检测,即磁性的表征,阻止了磁小体合成培养条件的优化,直接制约了磁小体的大量合成。虽然流式细胞仪用于趋磁细菌的检测已有报道,如宋涛等^[46]应用流式细胞仪检测趋磁细菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 菌液的细菌

浓度,比分光光度法更加精确;Zhang 等^[47]也将 AMB-1 用 PI 和 SYBR 双着色后用流式细胞仪检测其数量和大小,但尚未有更深入应用的报道。根据流式细胞仪的基本原理及只要所需检测微粒能用荧光染料标记就能被定量检测的特点,推测其可能用于趋磁细菌磁小体合成量的检测。由于趋磁细菌体内合成磁小体,且数量不等,所以磁小体的多少直接影响菌的胞内粒度大小,依据 FCM 的侧向散射光信息代表细胞的胞内粒度情况,FCM 可能是检测趋磁细菌磁小体量的一种方法。当然,这种方法只有能直接标记磁小体才具有说服力,但是目前尚未找到恰当的磁小体荧光探针,因此应用上还有待于趋磁细菌研究的进一步深入。

另外,FCM 也可能用于趋磁细菌非趋磁突变株与标准菌株的研究。研究人员经常观察到趋磁细菌能够自发形成非趋磁性突变体,即在同一培养环境和条件下,有个别菌体不合成磁小体,如 Schubbe 等^[48]报道,*Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 突变体 MSR-1B 的形成是因为一段约 80 kb 的 DNA 区域的缺失,而利用 FCM 可以检出含量低至 40 kb 的 DNA^[49],所以推测 FCM 可以用来发现非趋磁突变株,并可以利用流式细胞仪的分选功能将其与标准菌株分离,得到纯菌株,便于进一步的研究,对于阐明磁小体合成机理以及提高磁小体产量具有重大意义。存在的问题是,FCM 检出含量低至 40 kb 的 DNA 是在病毒中实现的,要在趋磁细菌中实现,须依赖流式细胞仪精度的进一步提高和趋磁细菌研究的进一步完善。

7 总结

流式细胞术的应用极广,一句话可概括为,凡能被荧光分子标记的细胞或微粒均能用流式细胞仪检测,尤其对于形体极其微小的粒子,其逐个检测、灵敏、快速、多参数分析等优势更为明显。除了它的前期成本比较高以外,FCM 存在的一个关键问题是荧光染料的选择和样品处理,这给荧光染料的发展提出了挑战。总之,随着科学技术的迅猛发展,流式细胞仪将有更广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Bryan PT, Stefan MG, Eleftherios TP. Development and application of flow-cytometric techniques for analyzing and sorting endospore-forming Clostridia[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(24): 7497-7506.
- [2] Michael R, Wolfgang B, Inez F, et al. Miniaturized flow cytometer with 3D hydrodynamic particle focusing and integrated optical elements applying silicon photodiodes[J]. Microfluid Nanofluid, 2011(10): 761-771.
- [3] Akshaya S, Christopher DS. Miniaturized on-sensor fluorescence flow cytometer[J]. Sensors IEEE, 2012: 1-4.
- [4] Zhao ST, Wu XD, Chen YQ, et al. High gain avalanche photodiode (APD) arrays in flow cytometer optical system[J]. Multimedia Technology (ICMT), 2011: 2151-2153.
- [5] Fan YJ, Sheen HJ, Chiou PY. High throughput and parallel flow cytometer with solid immersion microball lens array[J]. IEEE 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2012: 1041-1044.
- [6] Yang LL, Zhou YX, Zhu SB, et al. Detection and quantification of bacterial autofluorescence at the single-cell level by a laboratory-built high-sensitivity flow cytometer[J]. Analytical Chemistry, 2012(84): 1526-1532.
- [7] Fröhling A, Baier M, Ehlbeck J, et al. Atmospheric pressure plasma treatment of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* at polysaccharide surfaces: Inactivation kinetics and flow cytometric characterization[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2012(13): 142-150.
- [8] Mathys A, Chapman B, Bull M, et al. Flow cytometric assessment of *Bacillus* spore response to high pressure and heat[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2007(8): 519-527.
- [9] Grogan WM. Guide to flow cytometry methods[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1990: 1-20.
- [10] 李华, 常莹. 流式细胞仪工作原理与临床应用[J]. 中国医疗器械信息, 2011, 17(5): 37-45.
- [11] 王书奎, 周振英. 实用流式细胞术彩色图谱[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2004: 1-56.
- [12] 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所. GB/T 4789.2—2008 食品卫生微生物学检验: 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [13] Cantinieaux B, Courtoy P, Fondu P. Accurate flow cytometric measurement of bacteria concentrations[J]. Pathobiology, 1993, 61(2): 95-97.
- [14] 谢小军, 王冲, 何亮, 等. 流式细胞术计数细菌的研究[J]. 中国微生物学杂志, 2009, 21(6): 509-511.
- [15] Kim Y, Jett JH, Larson EJ, et al. Bacterial finger-printing by flow cytometry: bacterial species discrimination[J]. Cytometry, 1999, 36(4): 324-332.
- [16] Andrew W, Helen H, Colin RT, et al. Multi-parameter flow cytometry and cell sorting reveal extensive physiological heterogeneity in *Bacillus cereus* batch cultures[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(7): 1395-1405.

- [17] Valdivia RH, Falkow S. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction[J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 22(2): 367-378.
- [18] Gunasekera TS, Attfield PV, Veal DA. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(3): 1228-1232.
- [19] 刘道亮, 赵占民, 胡连霞, 等. 应用流式细胞技术快速检测液态商品中的细菌总数[J]. *食品科学*, 2011, 32(2): 157-163.
- [20] Malacrino P, Zapparoli G, Torriani S. Dellaglio rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45(2): 127-134.
- [21] Tobias B, Res PO, Pascal H, et al. Real-time on-line flow cytometry for bioprocess monitoring[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 154(4): 240-247.
- [22] Mansour JD, Robson JA, Arndt CW, et al. Detection of *Escherichia coli* in blood using flow cytometry[J]. *Cytometry*, 1985, (6): 186-190.
- [23] Suller MTE, Lloyd D. Fluorescence monitoring of antibiotic-induced bacterial damage using flow cytometry[J]. *Cytometry*, 1999, 35(3): 235-241.
- [24] 付亮, 龙军, 袁小澎. 流式细胞术快速检测产超广谱β-内酰胺酶细菌的研究[J]. *广东医学*, 2011, 32(4): 626-631.
- [25] Qin DL, He XX, Wang KM, et al. Using fluorescent nanoparticles and SYBR Green I based two-color flow cytometry to determine *Mycobacterium tuberculosis* avoiding false positives[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24(4): 626-631.
- [26] Yang YC, Tsai MH, Cheng HF. Determine the potency of BCG vaccines by flow cytometer[J]. *Medical Biotechnology*, 2011, 25(2): 2394-2398.
- [27] William CS, Craig AS, Prabir KD, et al. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* spores by multiparameter flow cytometry[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(16): 5220-5223.
- [28] Li SP, Guo N, Wu HY, et al. High efficient mixed culture screening and selected microbial community shift for bioleaching process[J]. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2011, (6): 1383-1387.
- [29] Wagner M, Amann R, Lemmer H, et al. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, (59): 1520-1525.
- [30] Lange JL, Thorne PS, Lynch N. Application of flow cytometry and in situ hybridization for assessment of exposures to airborne bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(4): 1557-1563.
- [31] Jean CT, Marcel D, Yves St-Pierre, et al. Quantitative flow cytometric detection of specific microorganisms in soil samples using rRNA targeted fluorescent probes and ethidium bromide[J]. *Cytometry*, 1997, 27(3): 224-232.
- [32] Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(6): 1919-1925.
- [33] Wallner G, Amann R, Beisker W. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms[J]. *Cytometry*, 1993, 14(2): 136-143.
- [34] Zarda B, Amann R, Wallner G, et al. Identification of single bacterial-cells using digoxigenin-labeled, ribosomal-RNA-targeted oligonucleotides[J]. *Journal of Genetic Microbiology*, 1991, 137(12): 2823-2830.
- [35] Joachimsthal EL, Ivanov V, Tay ST, et al. Bacteriological examination of ballast water in Singapore Harbour by flow cytometry with FISH[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2004, 49(4): 334-343.
- [36] Yamaguchi N, Nasu M. Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, 83(1): 43-52.
- [37] Yamaguchi N, Nasu M, Choi ST, et al. Analysis of the life cycle of *Bacillus megaterium* by fluorescein diacetate/propidium iodide double staining method[J]. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, 1994, (22): 65-68.
- [38] Lopez-Amoros R, Mason DJ, Lloyd D. Use of two oxonols and a fluorescent tetrazolium dye to monitor starvation of *Escherichia coli* in sea water by flow cytometry[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1995, (22): 165-176.
- [39] Spizzichino V, Fiorani L, Lai A, et al. First studies of pico- and nanoplankton populations by a laser scanning flow cytometer[J]. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, 2011, 112(5): 876-882.
- [40] Zhou Q, Chen W, Zhang HY, et al. A flow cytometer based protocol for quantitative analysis of bloom-forming cyanobacteria (*Microcystis*) in lake sediments[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(9): 1709-1716.
- [41] Blakemore RP. Magnetotactic bacteria[J]. *Science*, 1975, 190: 377-379.
- [42] Xie JP, Liu XX, Liu WB, et al. Extraction of magnetosome from *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Biomagnetism*, 2005, 1(3): 36-38.
- [43] 刘新星, 武海艳, 刘文斌, 等. 氧化亚铁硫杆菌中磁小体形成相关基因在不同亚铁浓度刺激下的差异表达[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(1): 69-75.
- [44] Gao T, Xie JP, Ding JN. Extraction and purification of magnetic nanoparticles from strain of *Leptospirillum ferriphilum*[J]. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2006, (16): 1417-1420.
- [45] 梁万洁. *Ferroplasma thermophilum* L1体内磁性颗粒的形成集及性质研究[D]. 长沙: 中南大学硕士学位论文, 2012.
- [46] 宋涛, 霍小林, 吴石增. 生物电磁特性及其应用[M]. 北京: 北京工业大学出版社, 2008: 78-90.

- [47] Zhang FL, Zhang KY, Zhao SJ, et al. Metamorphosis of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 cells[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(2): 304-309.
- [48] Schubbe S, Kube M, Scheffel A, et al. Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum*

- gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(19): 5779-5790.
- [49] Brussaard CPD, Dominique M, Gunnar B. Flow cytometric detection of viruses[J]. Journal of Virological Methods, 2000, 85(1/2): 175-182.

2014 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	第五届全国微生物基因组及组合生物学学术研讨会	中国微生物学会	5月	180	湖北武汉	周萍 027-87287254
2	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会暨中国畜牧兽医学会生物制品学分会学术大会	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	5月	300	辽宁沈阳	丁家波
3	第四届全国人畜共患病学术研讨会	中国微生物学会等	5月	300	吉林长春	王旭 010-64807200
4	第五届传染病防控基础研究与应用技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	6月	300	山东济南	吕向征 010-85158365
5	昆虫与微生物联合转化废弃物机制及资源化利用	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	6月	120	湖北武汉	张吉斌 027-87287702-8206
6	第五届全国农业微生物研究及产业化研讨会暨第十四届全国杀虫微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7月	200	云南昆明	邹成钢 0871-5031092
7	2014年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	8月	700	黑龙江哈尔滨	杨海花 王旭 010-64807200
8	第五届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	9月	400	四川成都	刘辉
9	病原真菌与宿主相互作用研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	9月	100	江苏常州	卫风莲
10	第十二届全国土壤微生物学术讨论会暨第五届全国微生物肥料生产技术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	9月	260	广东广州	沈德龙 马鸣超 010-82108702, 82106208
11	第四届北京中关村生物应急与临床POCT技术创新论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	10月	300	北京	肖瑞峰 010 - 61271105
12	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会第三届学术研讨会	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	待定	100	待定	贾晓娟
13	2014年全国微生物毒素与脓毒症学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10月	300	浙江杭州	李会
14	第二届微生物与白酒酿造技术研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	待定	200	山东	翟磊
15	中日韩国际酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	11月	200	韩国济州	欧阳浩森 010-64807420
16	第十七次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11月	500	四川成都	蒋建东 025-84396314
17	第二届中国放线菌生物学与产业化大会	中国微生物学会分子微生物学及生物工程专业委员会	11月	150	广东广州	张长生 020- 89023105
18	第六届微生物资源学术暨微生物资源平台运行服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	11月	300	福建厦门	姜瑞波 010-82108636