

荧光原位杂交在环境微生物学中的应用及进展

邢德峰, 任南琪, 李建政

(哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要: 荧光原位杂交技术广泛用于分析复杂环境的微生物群落构成, 可以在自然生境中监测和鉴定微生物, 并能对未被培养的微生物进行检测。rRNA 为靶序列寡核苷酸或 PNA 探针的荧光原位杂交能提供微生物的形态学、数量、空间分布等信息, 现已成为环境科学研究领域中的热点技术。对荧光原位杂交技术的发展和在环境微生物学中的应用进行了综述, 探讨了该技术的应用和发展前景。

关键词: 荧光原位杂交; 16S rRNA; 寡核苷酸探针; PNA; 环境微生物; 微生物生态学

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6929(2003)03-0055-04

Application and Progress of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Environmental Microbiology

XING De-feng, REN Nan-qi, LI Jian-zheng

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) has been widely applied for analyzing the composition of microbial communities in complex environmental samples. The examination and identification of individual microbial cells within their natural habitat could be performed, and those yet-to-be cultured microorganisms could be visualized by this technology. The information about morphology, number and spatial distribution of the microorganisms could be provided by FISH within rRNA-targeted oligonucleotide probes or PNA. Furthermore, it is a powerful tool for studying environmental microbiology. The authors reviewed the major techniques and progresses of FISH, and its applications in microbial ecology, and subsequently discussed the perspectives of FISH.

Key words: fluorescence *in situ* hybridization (FISH); 16S rRNA; oligonucleotide probe; PNA; environmental microorganisms; microbial ecology

在三废的综合治理中广泛应用到生物降解方法, 因此只有充分了解环境微生物学和群落演替规律等生物学特性, 才能提高环境科学研究中的生物学效能, 推动和深化环境整治工作, 合理利用环境资源。传统菌种分离培养的鉴定方法不仅耗时费力, 而且不能精确地反映混合菌群的组成和多样性, 对于一些培养条件要求苛刻或未被培养的细菌往往不能达到预期效果^[1]。近几年, 随着分子生物学技术如分子杂交、PCR、核酸测序等的发展, 微生物学研究领域发生了深刻的变革, 灵敏的检测和精确的细菌鉴定成为可能。借助分子生物学方法进行特异微生物的快速检测和鉴定已成为现代微生物诊断和生态学研究的重要手段。荧光原位杂交技术 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 结合了分子生物学的精确性和显微镜的可视性信息, 可以在自然或人工的微生物生境中监测和鉴定不同的微生物个体, 同时对微生物群落进行评价。FISH 技术被广泛应用于揭

示微生物的原位生理学特性和功能, 现已成为微生物分子生态学研究的重要技术手段。

1 FISH 技术的发展和原理

1969 年, Pardue 等^[2]和 John^[3] 两个研究小组发明了原位杂交技术 (*in situ* hybridization, ISH), 这一技术可以在保持细胞形态完整性的条件下, 检测出细胞内核酸序列。1988 年, Giovannoni 等^[4]首次将 ISH 技术引入细菌学的研究, 使用放射性标记 rRNA 寡核苷酸探针检测微生物。1989 年, DeLong^[5]首次使用荧光标记寡核苷酸探针检测单个微生物细胞。与放射性探针相比, 荧光探针更安全, 具有较好的分辨力, 不需要额外的检测步骤。此外, 可用不同激发和散射波长的荧光染料标记探针, 在一步反应中同时检测几个靶序列。近几年, 由于 FISH 技术的灵敏性和快捷性使其成为微生物系统发育学、微生物生态学、微生物诊断学和环境微生物学研究的有力工具^[6]。FISH 技术检测核酸序列是利用荧光标记的探针在细胞内与特异的互补核酸序列杂交, 通过激发杂交探针的荧光来检测信号。该技术主要包括以下几个步骤: 样品固定; 样品的预处理; 预杂交; 探针和样品变性; 杂交; 漂洗去除未结合的探针; 检测杂交信号。

收稿日期: 2002-11-11

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目; 国家 973 重点基础研究资助项目 (G2000026402)

作者简介: 邢德峰 (1977-), 男, 黑龙江讷河市人, 博士研究生。

2 rRNA 为靶序列的 FISH 检测

在微生物学研究中 FISH 检测最常使用的靶序列是 16S rRNA,这是由于 16S rRNA 具有遗传稳定性,它的结构域具有保守区和可变区^[7]。对于每个分类水平,根据 rRNA 目标区域可设计寡核苷酸探针,进行种属特异性鉴定。16S rRNA 基因比较测序在进行微生物鉴定时是最简便和准确的,尤其是对混合菌群和未被培养的微生物进行诊断时更为重要。在每个处于复制和代谢活跃的细胞中高拷贝的 16S rRNA 通常为监测单个细菌细胞提供了足够的靶序列。其他的靶序列如 23S rRNA^[8],18S rRNA^[9-10]和 mRNA^[11]也被成功地用于 FISH 检测。近年来,广泛应用寡核苷酸探针或 PNA 探针的 FISH 技术对特异微生物进行了鉴定和定量分析^[12],表 1 中列举了一些微生物 FISH 杂交中应用的特异寡核苷酸探针。

表 1 微生物 FISH 杂交中应用的特异寡核苷酸探针

Table 1 Specific oligonucleotide probes used for *in situ* hybridization to determine the presence of bacterial groups

探针	序列(5'→3')	特异性	靶位点
ARCH915 ^[13]	GTCCTCCCCGCCAATTCCT	Archaea	16S rRNA, 915 - 934
EUB338 ^[13]	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubacteria	16S rRNA, 338 - 355
NHQC ^[14]	TATAGTACGGCCGCCGT	Low % G + C Bacteria	23S rRNA, 1901 - 1918
HGC69a ^[13]	TATAGTACCAACGCCGT	High % G + C gram positive bacteria	23S rRNA, 1901 - 1918
ALF1b ^[13]	CGTTCG(CT)TCTGAGCCAG	α - Proteobacteria	16S rRNA, 19 - 35
ALF968 ^[15]	GGTAAAGGTCTGCGCGTT	α - Proteobacteria, some δ - Proteobacteria	16S rRNA, 968 - 985
BET42a ^[13]	GCCTTCCCACTTCGTTT	β - Proteobacteria	23S rRNA, 1027 - 1043
GAM42a ^[13]	GCCTTCCCACTTCGTTT	γ - Proteobacteria	23S rRNA, 1027 - 1043
SRB385 ^[13]	CGGCGTCGCTGCGTACAG	δ - Proteobacteria	16S rRNA, 385 - 402

3 FISH 诊断环境微生物多样性

环境微生物的研究主要是依赖于纯培养,由于环境微生物中只有一部分能被培养,因此,进行微生物多样性分析时其结果往往是局限的。研究不同的环境微生物时发现显微镜下可见的微生物 99% 以上通过常规方法不能被培养^[16],可见对不同环境样品研究时微生物的总数远远超过被培养的数量。微生物生态系统的比较 rRNA 测序分析比分类研究应用得更广泛,原因是核酸序列可以提供遗传距离、分子杂交探针等信息,可进一步用于鉴定、监测自然生态系统中的微生物^[17]。FISH 技术可以再现微环境中完整细胞的景象信息,具有更好的精确性,因此在环境微生物多样性等研究领域被广泛采用。近几年,应用 FISH 技术研究自然环境微生物群落的报道较多,如海水沉积物^[18]的群落,海水^[19]、河水^[20]和高山湖雪水^[21]的浮游菌体、土壤^[22]和根系表面^[23]的寄居群落。FISH 技术不仅能提供某一时刻的微生物景象信息,还能监测生境中的微生物群落和种群动

态,如海水沉积物连续流培养的微生物群落、原生动物摄食的增加对浮游生物组成的影响、季节变化对高山湖水微生物群落的影响等。此外,应用 FISH 技术检测和鉴定未被培养的种属或新种属,如巨大硫酸盐细菌(*Thiomargarita namibiensis*)^[24]、全噬菌属(*Holophaga*)和酸杆菌属(*Acidobacterium*)^[25]等。FISH 技术对于探明自然菌群的生态学组成,以及群落对自然和人为因素动态变化的应答研究均是最有力的技术手段。

4 FISH 在水污染控制微生物生态学中的应用

早在 1914 年,Arden 和 Lockett^[26]就发明了活性污泥法净化废水,然而在废水处理过程中微生物群落的作用和生态学特性一直没有得到深入地研究。研究活性污泥等复杂微生物群落时,分子生物学分析显示混合菌群具有较高的多样性,但是只有非常少的微生物被分离和鉴定。可见,只有了解微生物个体、群落多样性以及絮体形成等特性,才能提高对处理系统的控制能力。在废水处理中对活性污泥功能菌群进行检测和计数,并掌握其原位生理学信息是一项重要的内容。常规的方法是通过检测特异底物转化率来研究活性污泥中重要功能菌群的活性,如氧消耗率、硝化、反硝化、磷吸收和释放、Fe³⁺ 的还原等。FISH 技术能提供处理过程中微生物的数量、空间分布和原位生理学等信息。放射自显影和 FISH(MAR - FISH)结合被用于研究水体微生物,检测细菌生活力、数目和对特异有机底物的消耗^[27]。16S rRNA 为靶序列的 FISH 检测技术是快速可靠的分子生物学工具,可以不依赖培养方法监测环境样品中的种群并对其系统进行分类。这种方法被用于检测活性污泥微生物群落结构和数目,同时对特异菌群进行空间定位和原位生理学的研究。

4.1 FISH 监测废水处理中的微生物群落

rRNA 测序和 FISH 结合的群落分析广泛用于监测生物反应器或废水处理厂的微生物多样性。应用共聚焦激光扫描显微镜(Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM)的 FISH 技术可以对生物膜和活性污泥絮体的特异种群进行空间分布研究。Domingues 等^[28]应用 CLSM - FISH 研究了不同反应器的厌氧生物膜中的乙酸氧化细菌、脱硫微菌属、产甲烷细菌、硫酸盐还原细菌的分布。Amann^[29]和 Snaidr^[30]根据 PCR 扩增的 rRNA 序列设计寡核苷酸探针,用 FISH 技术诊断活性污泥中的微生物群落结构。Schramm^[31]和 Juretschko^[32]等在硝化流化床反应器和活性污泥中研究了亚硝酸氧化细菌和氨氧化细菌的数量和空间分布。Silyr Roberts 等^[33]应用 FISH 技术对废水处理湿地生物膜进行了研究,结果表明亚硝化单胞菌属是主要的氨氧化细菌。Bond 等^[34]应用 FISH 技术对活性污泥生物除磷的菌群进行了鉴定。Tagawa 等^[35]应用 FISH 技术揭示了 UASB 反应器中颗粒污泥的微生物生态学结构,试验结果显示古细菌是颗粒污泥中的优势种群,产甲烷细菌的种群密度与乙酸的利用是正相关的。Syutsubo 等^[36]研究了 UASB 反应器中高温颗粒污泥的厌氧微生物群落,随着底物的变化的种群动态变化规律。Sekiguchi 等^[37]研究了 UASB 反应器中高温和中温颗粒污泥的厌氧微生物群落,揭示了微生物的多样性和空间分布,对其原位生理学和功能进行了探讨。Sorensen 等^[38]和 Rocheleau^[39]等在厌氧消化和

厌氧污泥颗粒中应用 FISH 技术对古细菌如产甲烷菌等进行了分子诊断。Schuppler 等^[40]发现生活污水处理厂的丝状泡沫物中存在放线菌菌群,同时研究了引起污泥膨胀的菌群。

4.2 FISH 技术用于原位生理学和功能性研究

Nielsen 等^[41]对工业废水处理厂活性污泥的细菌表面疏水性进行了原位检测,应用 FISH 技术结合细胞表面微球体(Microsphere Adhesion to Cells,MAC)分析,研究了丝状细菌的胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substances,EPS)。Schramm 等^[42]将 FISH 和微传感器结合,同时分析微生物群落和代谢活性,揭示了厌氧微生物在有氧环境中的缺氧微生态位。近年来,绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein,GFP)分子被应用到微生物生态学的研究中,将不同的基因插入微生物的质粒或染色体 DNA,表达的绿色荧光蛋白分子能在单细胞水平可视化和监测启动子活性或基因中表达。Eberl 等^[43]应用结合报告基因分析的 FISH 技术研究了活性污泥的微生物生态学。Møller 等^[44]研究了生物膜的微生物空间分布、启动子诱导及其表达的时序进程,同时对菌群间的相互影响进行了分析。Christensen 等^[45]用 FISH 技术鉴定了生物膜中的恶臭假单胞菌,并将 *gfp* 基因标签的质粒导入该菌获得了景象信息。

5 FISH 技术的应用前景及展望

应用在线监测活性污泥絮体或生物膜中特异的化合物,如氧、硫化氢、硝酸盐、亚硝酸盐或 pH 值等是目前采用的主要分析方法。常规的在线分析结合 FISH 技术,既能监测生物膜的生长和群落组成动态及其代谢活性,又可以揭示影响因子与生物相动态变化的映射规律。FISH 技术可用于确定细胞和组织中特异性转录物定位及其表达的相对水平,这一技术将是研究复杂环境中原位基因表达和代谢水平最有利的手段。结合报告基因分析的 FISH 技术对于复杂微生物群落的结构、功能分析也是十分有利的。PNA (Peptide Nucleic Acid,即核酸肽)探针具有稳定、不易降解和较高的杂交亲和力等特性,检测细菌细胞的 rRNA 具有较高的灵敏性,即使是细菌死亡一段时间后也可能被检测到。PNA 探针主链骨架是中性的,并且通常比寡核苷酸探针短,能够通过疏水的细胞壁,具有较好的渗透性。由此可见 PNA 探针将会进一步推动 FISH 技术在环境微生物学中的应用。最近,多彩 FISH (Multicolor FISH,MFISH) 技术可以通过多种标记的探针和荧光染料同时检测多个靶序列,对不同的种属进行鉴定和分类。

FISH 技术与其他技术的结合可为环境微生物学研究提供更多的信息。共聚焦激光扫描显微镜和多光子显微镜的应用,可获得较好的景深和清晰的图象,与微传感器相结合也是 FISH 技术在环境微生物学中的又一技术手段。Ophan 等^[46]将 FISH 和次级离子质谱结合(Secondary Ion Mass Spectrometry,SIMS)对厌氧条件下的甲烷氧化细菌进行了鉴定。Böckelmann 等^[47]应用 FISH 和凝集素分析技术对激流群落微生物的胞外物和糖结合物进行了分析。Strathmann 等^[48]应用荧光标记凝集素对生物膜中的铜绿假单胞菌胞外聚合物进行了监测。可以说,结合荧光显微镜和流式细胞计的 FISH 技术是诊断和评价复杂微生物群落的种群结构及其动态学最有前景的技术手段。

参考文献:

- [1] Wanger M, Amann R, Lemmer H, et al. Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59:1520-1525.
- [2] Pardue M L, Gall J G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1969, 64:646-650.
- [3] John H, Birnstiel M, Jones K. RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level[J]. Nature, 1969, 223:582-587.
- [4] Giovannoni S J, DeLong E F, Olsen G J, et al. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells[J]. J Bacteriol, 1988, 170:720-726.
- [5] DeLong E F, Wickham G S, Pace N R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells[J]. Science, 1989, 65:5554-5563.
- [6] Amann R, Krumholz L, Stahl D A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology[J]. J Bacteriol, 1990, 172:762-770.
- [7] Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA[J]. Nucl Acids Res, 1996, 24:3381-3391.
- [8] Trebesius K H, Hamsen D, Rakin A, et al. Development of rRNA-targeted PCR and *in situ* hybridization with fluorescently labeled oligonucleotides for the detection of *Yersinia* species[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36:2557-2564.
- [9] Lischewski A, Amann R, Hamsen D, et al. Specific detection of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by fluorescent *in situ* hybridization with an 18S rRNA-targeted oligonucleotide probe[J]. Microbiology, 1996, 142:2731-2740.
- [10] Baschien C, Manz W, Neu T R, et al. Fluorescence *in situ* hybridization of freshwater fungi[J]. International Review of Hydrobiology, 2001, 86(4/5):371-381.
- [11] Wanger M, Schmid M, Juretschko S, et al. *In situ* detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*[J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 160:159-168.
- [12] Sander H, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen J J, et al. Identification of *Brettanomyces* (*Dekkera bruxellensis*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67:938-941.
- [13] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev, 1995, 59:143-169.
- [14] Roller C, Wagner M, Amann R I, et al. *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides[J]. Microbiology, 1994, 140:2849-2858.
- [15] Anja B F, Isabell Fischer, Peter Proksch, et al. Temporal variation of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*[J]. FEMS Microb Ecol, 2001, 38:105-113.
- [16] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev, 1995, 59:143-169.
- [17] Norman R Pace. Molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. Science, 1997, 276:734-740.
- [18] Llobet-Brossa E, Rossello-Mora R, Amann R I. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64:2692-2696.
- [19] Alfrider A, Pernthaler J, Amann R, et al. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by *in situ* hybridization[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62:2138-2144.
- [20] Kenzaka T, Yamaguchi N, Tani K, et al. rRNA-targeted fluorescent *in situ* hybridization analysis of bacterial community structure in river water[J]. Microbiology, 1998, 144:2085-2093.
- [21] Weiss P, Schweitzer B, Amann R, et al. Identification *in situ* and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates (lake snow)[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62:1998-2005.
- [22] Felske A, Akkermans A D L, De Vos W M. *In situ* detection of an uncultured predominant *Bacillus* in dutch grassland soil[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64:4588-4590.
- [23] Macnaughton S J, Booth T, Embley T M, et al. Physical stabilization and confocal microscopy of bacteria on roots using 16S rRNA targeted fluorescently labeled oligonucleotide probes[J]. J Microbiol Methods, 1996, 26:279-285.
- [24] Schulz H N, Brinkhoff T, Ferdelman T G, et al. Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian Shelf sediments[J]. Science, 1999, 284:

- 493 - 499.
- [25] Ludwig W, Bauer S H, Bauer M, et al. Detection and *in situ* identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 153:181 - 190.
- [26] Arden E, Lockett W T. Experiments of the oxidation of sewage without the aid of filters[J]. J Sec Chem Ind, 1914, 33:523 - 539.
- [27] Nilsson C, Sundbäck K. Amino acid uptake in natural microphytobenthic assemblages studied by microautoradiography[J]. Hydrobiologia, 1996, 332:119 - 129.
- [28] Domingues M R, Araujo J C, Varesche M B A, et al. Evaluation of thermophilic anaerobic microbial consortia using fluorescence *in situ* hybridization (FISH)[J]. Water Sci Technol, 2002, 45(10):2733.
- [29] Amann R I, Snaird J, Wagner M, et al. *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community[J]. J Bacteriol, 1996, 178:3496 - 3500.
- [30] Snaird J, Amann R, Huber I, et al. Phylogeny analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63:2884 - 2896.
- [31] Schramm A, De Beer D, Wagner M, et al. Identification and activities *in situ* of *Nitrosospora* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64:3480 - 3485.
- [32] Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, et al. Combined molecular and conventional analysis of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira* like bacteria as dominant populations [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64:3042 - 3051.
- [33] Silyn- Roberts G, Lewis G. *In situ* analysis of *nitrosomonas* spp. in wastewater treatment wetland biofilms[J]. Water Res, 2001, 35(11):2731 - 2739.
- [34] Bond P L, Erhart R, Wagner M, et al. Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65:4077 - 4084.
- [35] Tagawa T, Sytsubo K, Sekiguchi Y, et al. Quantification of methanogen cell density in anaerobic granular sludge consortia by fluorescence *in situ* hybridization[J]. Water Sci Technol, 2000, 42(3/4):77 - 82.
- [36] Sytsubo K, Sinthurath N, Ohashi A, et al. Population dynamics of anaerobic microbial consortia in thermophilic granular sludge in response to feed composition change[J]. Water Sci Technol, 2001, 43(1):59 - 66.
- [37] Sekiguchi Y, Kamagata Y, Ohashi A, et al. Molecular and conventional analyses of microbial diversity in mesophilic and thermophilic upflow anaerobic sludge blanket granular sludges[J]. Water Sci Technol, 2002, 45(10):19 - 25.
- [38] Sorensen A H, Torsvic V L, Torsvic T, et al. Whole-cell hybridization of *methanosarcina* cells with two new oligonucleotide probes[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63:3043 - 3050.
- [39] Rocheleau S, Greer C W, Lawrence J R, et al. Differentiation of *Methanosarcina barkeri* in anaerobic mesophilic granular sludge by fluorescent *in situ* hybridization and confocal scanning laser microscopy[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65:2222 - 2229.
- [40] Schuppler M, Wanger M, Schön G, et al. *In situ* identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes[J]. Microbiology, 1998, 144:249 - 259.
- [41] Nielsen J L, Mikkelsen L H, Nielsen P H. *In situ* detection of cell surface hydrophobicity of probe-defined bacteria in activated sludge[J]. Water Sci Technol, 2001, 43(6):97 - 103.
- [42] Schramm A, Santegedts C M, Nielsen H K, et al. On the occurrence of anoxic microniches, denitrification and sulfate reduction in aerated activated sludge[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65:4189 - 4196.
- [43] Eberl L, Schulze R, Ammendola A, et al. Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 149:77 - 83.
- [44] Möller S, Sternberg C, Andersen J B, et al. *In situ* gene expression in mixed-culture biofilms evidences of metabolic interactions between community members[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64:721 - 732.
- [45] Christensen B B, Sternberg C, Andersen J B, et al. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64:2247 - 2255.
- [46] Ophan V J, House C H, Hinrichs Kai-Uwe, et al. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments[J]. Microbiology, 2002, 99(11):7663 - 7668.
- [47] Böckelmann Uta, Manz Werner, Neu T R, et al. Investigation of lotic microbial aggregates by a combined technique of fluorescent *in situ* hybridization and lectin binding analysis[J]. J Microbiol Methods, 2002, 49:75 - 87.
- [48] Strathmann Martin, Wingender Jost, Flemming Hans-Curt. Application of fluorescently labeled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Microbiol Methods, 2002, 50:237 - 248.

(上接第 36 页)

表 2 M-25 的正交实验结果

Table 2 The result of the orthogonal test of Strain M-25

实验号	A	B	C	D	絮凝率/%
1	1	1	1	1	97.92
2	1	2	2	2	90.58
3	1	3	3	3	50.75
4	2	1	2	3	99.67
5	2	2	3	1	97.75
6	2	3	1	2	—
7	3	1	3	2	89.08
8	3	2	1	3	47.75
9	3	3	2	1	69.58
$E_1^{(1)}$	79.75	95.56	48.56	88.42	$E_{\text{平}} = 71.45$
E_2	65.81	78.69	86.61	59.89	
E_3	68.80	40.11	79.19	66.06	
$\alpha_1^{(2)}$	8.30	24.11	-22.89	16.97	
α_2	-5.64	7.24	15.16	-11.56	
α_3	-2.65	-31.34	7.74	-5.39	
极差	13.94	55.45	38.05	28.53	

1) E_i 为某因素某水平下的平均絮凝率;

2) α_i 为 E_i 与 $E_{\text{平}}$ 的差值,代表了不同因素水平下的水平效应。

3 结论

筛选出 1 株具有高效絮凝活性的微生物,经鉴定为曲霉属,命名为 *Aspergillus M-25*;通过正交实验,优化了该微生物产絮凝剂的培养条件为:查氏培养基培养,初始 pH 为 5.0,摇床转

速为 140 r/min,水浴温度为 25℃,发酵时间为 3 d,发酵液对高岭土的絮凝率达到 97.15%。

参考文献:

- [1] 肖锦,纪永亮.我国絮凝剂现状和对策[J].现代化工,1997,(12):6 - 9.
- [2] 吕向红.微生物絮凝剂[J].化工环保,1994,15:211 - 218.
- [3] Nakamura J. Purification and chemical analysis of microbial cell flocculants produced by *aspergillus sojae* AJ7002[J]. Agric Biol Chem, 1976, 40(3):619 - 624.
- [4] Zhang Tong, Lin Zhe. Microbial flocculant and its application in environmental protection[J]. Environ Sci, 1999, 1(1):1 - 12.
- [5] 陆茂林,施大林,王蕾,等.絮凝剂产生菌的筛选和发酵条件研究[J].工业微生物,1997,27(2):25 - 33.
- [6] 宫小燕,王竞,周集体.絮凝剂产生菌的筛选及其培养条件优化[J].环境科学研究,1999,12(4):9 - 11.
- [7] 程金平,郑敏,张兰英.微生物絮凝剂产生菌的筛选及产絮凝剂的周期研究[J].环境科学与技术,2001,2(3):12 - 15.
- [8] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
- [9] 韦伯斯特 J.真菌导论[M].张素轩译.北京:中国林业出版社,1982.
- [10] 胡筱敏,邓述波,罗茜.酱油曲霉絮凝特性的研究[J].中国有色金属学报,1998,8(S2):529 - 532.
- [11] 张森林.科技研究与开发[M].湖南:湖南科学技术出版社,1993.
- [12] Kurane R, Itoeda K, Takeda K, et al. Culture conditions for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*[J]. Agric Biol Chem, 1986, 50(9):2309 - 2401.