

# 水生细菌荧光显微计数法的应用和发展

许兵 徐怀恕

(青岛海洋大学海洋生物系, 青岛 266003)

在微生物生态学研究, 环境样品细菌数量的测定, 对于确定该环境中细菌生物量及细菌异养活性, 研究细菌与所处环境的相互作用, 是非常重要的。多年来, 对水环境中细菌数量的测定一直借鉴沿用临床微生物学的培养方法, 如涂布平板法、液体培养法等。在某些情况下, 用培养法来测定某种生理类型的细菌数量是可行的。但由于细菌分类及生理类型上的多样性, 培养法只能计出样品中部分活细菌。以该类方法来研究水生细菌生物量及生态作用则存在明显不足<sup>[1]</sup>。因此, 如何准确测定水环境中的细菌数量就成为微生物生态学的一个重要研究内容。

由于多数水环境样品中所含细菌数不超过  $10^6$  cells/ml, 为了能进行直接、快速计数, 人们设计出滤膜法, 以加大计数的水体体积, 起初, 多用纤维素(醋酸纤维素酯或硝酸纤维素酯)滤膜, 过滤一定量的水体, 然后固定、染色。干燥后用普通光学显微镜(或不经染色直接用相差显微镜)计数。由于所用染料(如藻红)对水体中细菌与有机碎屑、无机颗粒等选择性较小, 故具有类似细菌形状的着色颗粒都被计数在内, 导致计数结果偏高<sup>[2]</sup>。自从荧光显微计数法应用于微生物生态学研究领域, 对于环境中细菌总数及活细菌数测定的准确性有了很大提高。近年来, 国外发展了几种常用的水生细菌直接计数方法, 本文予以综述介绍。

## (一) 吖啶橙染色直接计数法

1. 方法: Fransisco 等<sup>[3]</sup>最早应用该方法计数自然水体中的细菌总数, 从而确定了该方法的基本程序。后经 Zimmermann 和 Meyer-

Reil<sup>[4]</sup>、Daley 和 Hobbie<sup>[5]</sup>以及 Hobbie 等<sup>[6]</sup>的修改而成为目前较为通用的方法。基本操作如下。现场取水样 10ml 于带螺旋盖的试管中, 加入 0.5ml 36% 的甲醛固定样品, 将 0.1% 的吖啶橙溶液加入样品(通常取 2ml)中, 染色 2-3min, 然后将细菌过滤到事先用 Irgalan 黑染色的孔径为  $0.2\mu\text{m}$  的聚碳酸酯滤膜上。冲洗后将滤膜置于载玻片上, 滴上一滴无自发荧光的香柏油, 盖上盖玻片, 置于落射光荧光显微镜(100倍油镜)下计数约 10 个视野中的菌数(每个视野约 30 个左右细菌, 否则稀释或加大样品体积)。经测量视野面积及滤膜有效面积而换算出样品中所含细菌数量。

2. 特点及应用范围: 荧光显微直接计数法的广泛应用, 在技术上依赖于三个方面的进步。其一是专一性荧光染料的应用, 主要是吖啶橙(AO)<sup>[6]</sup>、4', 6-二酰胺-2-苯基吡啶(DAPI)<sup>[7]</sup>等。它们可以和细胞中的核酸物质特异结合。在 AO 染色中, 视野中菌体呈现的颜色与菌体细胞内 RNA 和 DNA 的含量有关。处于快速生长状态的菌体细胞内含有相对多的 RNA 和单链 DNA, 它们吸收 AO 后, 在荧光显微镜下呈现红色荧光。而处于不活跃或休眠状态的细菌细胞内主要核酸成份双链 DNA 与 AO 结合后, 发出绿色荧光<sup>[6,8]</sup>。死亡细菌细胞中的 DNA 被破坏成单链 DNA, 吸收 AO 后, 亦呈现红色荧光<sup>[6]</sup>。另外, 菌体的荧光颜色也与样品处理过程关系密切<sup>[8]</sup>。正是由于 AO 等荧光染料与核酸物质的特异性结合, 才使得荧光显微计数法在计数那些体积微小的细菌时比使用普通光学显微镜和相差显微镜更为准确。第二是聚碳酸酯

滤膜的应用。使用荧光显微镜计数的理想滤膜应当具备下列条件：①滤膜自发荧光少，②不含有微生物污染物，③能使滤膜上的所有细菌都处于同一平面上。聚碳酸酯滤膜完全满足上述要求。这种滤膜表面平整，孔径大小均匀，经过预染（Irgalan 黑或苏丹黑）消除了滤膜的自发荧光。镜下观察，过滤后的细菌分散在滤膜表面，处于同一平面上。而在早期的直接镜检计数中使用纤维素滤膜，由于滤膜的海绵状结构，使得许多体积较小的细菌嵌入膜的孔隙之中，从而影响了计数的准确性。第三是落射光荧光显微镜的应用。它克服了透射型荧光显微镜的许多不足之处，使得荧光显微计数法不仅可以应用于多种水环境<sup>[6,9,10]</sup>、沉积物<sup>[9]</sup>样品，也可用于水下物体表面附着细菌的直接计数，包括不透明物体如钢片<sup>[11]</sup>。这就大大增加了荧光显微计数法的应用范围。

水生微生物学应用吖啶橙染色直接镜检计数（AODC）法取得的一个重要进展，就是证实尽管河口及海湾水体中附着细菌所占比例较高，但海水中大多数细菌是营浮游生活的<sup>[12]</sup>。过去人们对此问题的认识可能是由于受到方法学的局限，即无法计数水中那些体积微小的细菌。

水体中细菌生物量的测定可以通过测定细菌的数量和体积而经换算得到<sup>[13]</sup>。但用普通光学显微镜测量细菌体积，既麻烦又不精确。而利用扫描电镜也较繁琐且费用较高。脂多糖法，即利用鲎阿米巴细胞溶胞产物与细菌脂多糖的反应，也可用于细菌生物量的测定，但由于花费较高，其应用也受到局限。而 AODC 法的计数结果与脂多糖法有很好的相关性。将落射光荧光显微镜与影像分析仪及微机联机，测定水体中细菌数量、体积及生物量已实现自动化<sup>[13,14]</sup>。

3. 影响因素：进行荧光显微计数需要注意几个方面。其一，计数所用各种溶液（包括固定剂、染液、冲洗用水等）均需经 0.2 $\mu\text{m}$  孔径的滤膜过滤除去悬浮的颗粒物质，并经常检查溶液中的细菌数量，一旦超过一定数量即需要

重新过滤或配制。其二，某些非细菌颗粒对 AO 的非特异性吸附，致使样品中体积较小的细菌计数仍有偏差。另外，细菌在滤膜表面的分散也并非完全均匀，只有随机计数多个视野，才能尽量减少这方面的误差。再者，染色步骤、样品过滤体积的差异，不同的荧光显微镜以及研究者的主观因素等均可造成计数偏差。Nagata 等<sup>[15]</sup>来自 7 个实验室的 10 位研究者对上述影响因素进行了综合研究。5 个实验室的 7 位研究者使用各自实验室的计数操作方法，对一个淡水样品和二一个海水样品进行计数。结果淡水样品中细菌计数值变异系数为 36%，二个海水样品计数值的变异系数分别为 46% 和 94%。当 9 位研究者集中在一起在同一荧光显微镜上观察同一张 AODC 制片，三个淡水样品计数值变异系数为 24—29%，而一个海水样品计数值的变异系数可达 89%。造成计数偏差的原因主要是细菌在滤膜表面的不均一分布；以及对那些能非特异地吸附荧光染料的非细菌颗粒的判断上的差别。

尽管存在不足之处，AODC 法仍广泛用于各种水环境细菌总数的测定。为使我国的海洋调查等研究向国际先进水平看齐，国家技术监督局已将 AODC 法做为海洋细菌总数的计数方法列入国家标准。

## （二）活菌直接计数法

长期以来，困扰微生物生态学者的问题之一就是在显微镜下观察到的环境样品中的大多数细菌，无法用常规培养法计数出来。AODC 等直接计数法不能完全将活细胞与死亡细胞区分开来，致使计数值高于水体中的活菌数。Kogure 等<sup>[16]</sup>将荧光显微技术与培养法结合起来，设计出活菌直接计数法（DVC），较好地解决了水环境中活细菌计数问题。

1. 方法：DVC 法的原理是利用萘啶酮酸抑制细菌 DNA 的复制，但不影响细胞中其它合成途径的继续运转，在一定浓度营养物质存在下，菌体伸长、变大。经过荧光染色，可以很容易地将它们计数出来。实验步骤如下。各取水样 100ml 于两个容积为 250ml 的无菌三角

瓶中,瓶口塞无菌棉塞。向水样中加入 0.002% (W/V) 的萘啶酮酸和 0.025% (W/V) 的酵母膏,置于暗处,20℃培养 6h,以 2% (最终浓度) 甲醛固定后,吖啶橙染色,荧光显微镜下计数。视野中伸长、变粗、发橙红色荧光的菌体被认为是活菌。

2. 影响因素: ①抑菌剂: 该方法的关键是活细菌能够生长,但细胞分裂被抑制,从而通过菌体细胞的增大来计数活细菌。因此,抑菌剂的效果非常重要。由于 G<sup>+</sup> 细菌及部分 G<sup>-</sup> 细菌对萘啶酮酸有抗性,低浓度的萘啶酮酸不能抑制它们的繁殖,致使计数结果出现偏差。Kogure 等<sup>[17]</sup>对 DVC 法进行了修改,增加了对 G<sup>-</sup> 细菌(如葡萄球菌)有抑制作用的 Piromidic acid (PA) 和主要抑制 G<sup>-</sup> 细菌的吡哌酸 (PPA)。这样水体中大多数细菌的分裂将受到至少一种抑菌剂的作用。然而,有些细菌和铜绿色假单胞菌对三种抑菌剂均不敏感<sup>[17]</sup>。②培养基质: DVC 法使用酵母膏为营养物质,对水样进行短时间培养,以使菌体伸长、变粗。但若细菌不能利用酵母膏或使用的酵母膏浓度对寡养性细菌来说太高,都将导致计数值偏低。不同的基质及浓度对 DVC 计数值影响很大。500μg/ml 的酵母膏、蛋白胨均可做为海洋细菌 DVC 计数的良好基质。而葡萄糖、谷氨酸则不能用于海洋细菌的 DVC 计数<sup>[18]</sup>。基质浓度对 DVC 计数的影响与水体中有机物含量多少有关。当计数有机物较为丰富的生活污水中活细菌数时,分别添加 0.005% 和 0.025% 的酵母膏,培养 6h, DVC 计数值没有明显的差异<sup>[19]</sup>。③活细菌的颜色在 DVC 计数中,伸长、变粗的菌体会呈现不同的荧光颜色。Kogure 等<sup>[16]</sup>计数海水样品活菌数时,观察伸长、变粗的菌体均呈橙红色。对单菌株存活实验水体中细菌 DVC 计数时也发现相同现象<sup>[20]</sup>。有的研究者发现自然海水、湖水中细菌 DVC 计数变粗大的菌体多发绿色荧光<sup>[9,19]</sup>,生活污水中变粗大的菌体多发橙红色荧光<sup>[9]</sup>。由于细胞的荧光颜色还受到荧光染料浓度、染料以及样品 pH 等多种因素的影响<sup>[21]</sup>,故应当以菌体伸长、变粗

做为判断活细菌的标准。

3. 应用: Kogure 等<sup>[16]</sup>以 DVC 法计数大洋海水中的活细菌数为  $10^{3-4}$  cells/ml,高出平板计数法三个数量级,但低于总细菌数 (AODC) 一个数量级。日本东京湾污染情况较为严重,其中有机质含量较高。夏季,海水中 DVC 计数值占 AODC 值的 1.5-39.8% (平均 11.2%)。在相模湾及伊豆群岛海域寡养性海水中,细菌 DVC 值占 AODC 值的 0.7-7.9% (平均 2.8%)<sup>[22]</sup>。在湖水及生活污水中细菌 DVC/AODC 值可达 2.91% 和 36.21%,均高于常规培养法<sup>[19]</sup>。应用放射自显影技术证明,小生境中,单菌株 DVC 计数的 90% 是可以吸收基质的<sup>[22]</sup>。不同深度的海水中 DVC 计数高峰与<sup>14</sup>C 标记的氨基酸的吸收高峰相吻合<sup>[24]</sup>。

应用 DVC 技术的一个重要发现是证明了细菌的一种新的存活方式——活的非可培养状态<sup>[26]</sup>。将细菌(尤其是人类肠道病原菌)置于模拟水体中,低温下,水体中的细菌几天后即不能再用平板法或液体法培养出来。但 AODC、FAC (荧光抗体染色计数法) 计数结果表明水体中细菌数量没有明显减少,且细胞仍维持完整形态。以 DVC 法计数发现水体中的细菌仍然是活的<sup>[20]</sup>。放射自显影技术证明 DVC 中伸长、变粗的菌体可以吸收营养物质<sup>[22]</sup>。现已证明,大多数人类肠道病原菌在环境中均可形成活的非可培养状态<sup>[25]</sup>。因此,用常规培养法检测环境中的人类病原菌是不合适的。

除了对水体中细菌进行活菌计数外, DVC 法还可用于其它方面。目前,测定细菌对抗生素敏感性、化学杀菌剂的杀菌效果以及细菌对重金属的抗性和环境因子对细菌生长的影响等均以培养法为基本测试手段,并非真正对细菌能否生长或存活进行检验。在平板上(或液体中)不能繁殖成肉眼可见的菌落(或混浊)并不意味着细菌已经死亡,有的可能只是变成了活的非可培养状态,在培养条件下不能繁殖而已。一旦条件适宜,复苏后的病原菌仍具有致病力<sup>[25]</sup>。以 DVC 法测定细菌对抗生素的敏感性以及对重金属的抗性已获得美国专利。

### (三) 四氮唑还原直接计数法

1. 方法: 这是一种用于计数水环境中具有呼吸活性的细菌的方法。其理论依据是, 所有活的细菌必然具备电子传递系统(ETS), 这可以通过添加人工电子受体指示出来。当以 2-(对碘代苯)-3-(对硝基苯)-5-苯基氯化四氮唑(INT) 为人工电子受体时, 在活细胞内可将其还原成 INT 甲腈。显微镜下可见细胞内出现暗红色的斑点。基本操作步骤如下<sup>[26]</sup>。取 10ml 水样于无菌的螺盖试管中, 加入 1ml 0.2% 的 INT 溶液, 混合均匀后, 置暗处于现场温度下保持 20min, 然后加入 0.1ml 36% 甲醛终止反应(固定后的样品于 4℃ 暗处可存放一个月)。样品过滤、染色, 观察同 AODC 法。同时, 以透射光计数亮视野中胞内具有红色斑点的菌数。

2. 影响因素: 由于测定过程中不需添加任何底物, 且细胞的 ETS 活性并不因为人工电子受体的存在而增强, 故该方法不会导致与现场环境参数的明显差异<sup>[26]</sup>, 所得结果较为接近真实情况。实验表明, 甲醛<sup>[26]</sup>或加热<sup>[27]</sup>固定后的细菌不能还原 INT 成 INT 甲腈。延长培养时间也不能明显增加活菌计数值<sup>[20]</sup>。但有些因素影响到该方法的准确性: ①自然水体中许多细菌体积较小, 再要看清菌体内的红色斑点更加困难。事实上, 当细胞小于 0.4 $\mu$ m 时, 即无法看清胞内红色斑点的有无。②自然水体中有些活细菌代谢率非常低。在与 INT 接触时, 短时间内难以将其还原成可见的斑点。③观察时, 显微镜油与菌体直接接触可将细胞内 INT 甲腈溶解。④透射光亮视野下, 滤膜的背景不易与 INT 甲腈斑点区分开等。上述因素均可导致 INT 法计数活菌数量的减少。另外, 由于 INT 甲腈斑点的观察需透射光, 故 INT 法无法用于不透明物体表面附着细菌的计数。一些学者对 Zimmermann 等<sup>[26]</sup>的 INT 法进行了改进。Tabor 和 Neihof<sup>[28]</sup>设计的方法可以较好地避免镜油与菌体的接触, 减少背景干扰, 并且可使非菌体荧光颗粒在操作中被脱色而减少计数误差。方法要点是样品加 INT 溶液培养、固定、过

滤后, 将滤膜贴在一表面覆有一层明胶薄膜的盖玻片上, 使菌体与明胶膜直接接触, 明胶膜凝固后, 干燥。然后以柠檬酸盐缓冲液浸泡, 再用吡啶橙染色, 分别在不同 pH 的缓冲液中脱色, 至明胶膜中无 AO 颜色。揭去滤膜, 向盖玻片表面的明胶膜及其所固定的细菌上喷一层明胶膜。干燥后, 细菌菌体即被包埋在明胶薄膜的基质中。滴加香柏油, 透过盖玻片进行镜检。修改后的方法较原方法计出的活菌数高三倍, 检测美国切萨皮克湾海水中活菌数占总菌数的 56—61%, 高于以往其它方法所得结果<sup>[29]</sup>。Bitton 等<sup>[30,31]</sup>发展了一种孔雀石绿-INT (MINT) 方法计数水样中的活细菌。滤膜过滤后置于 100℃ 烘箱中烤 5min, 使菌体固定在滤膜上。用 1% 孔雀石绿染色, 然后吸除多余染液, 向滤膜表面滴加浓缩的果糖溶液, 盖上盖玻片, 亮视野油镜检查。浓缩的果糖溶液对 INT 甲腈斑点无溶解作用。同时, 由于使用孔雀石绿代替 AO 对菌体细胞染色, 使得总菌数及活菌数的计数均可在亮视野显微镜下进行。最近, Rodinguez 等<sup>[32]</sup>又推出一种新的染料 5-氨基-2, 3-联甲苯四氮唑盐酸盐 (CTC) 代替 INT 进行活菌计数。其优点是①CTC 被还原后形成的 CTC 甲腈在长波紫外光 (>350nm) 照射下, 可发出红色荧光, 可以很容易地将活菌与非生物颗粒及其它背景物质区分开来。②CTC 甲腈不溶于香柏油, 制片在室温下放置几天, 菌体中的 CTC 甲腈仍可发出稳定的荧光。③由于 CTC 甲腈可发出荧光, 使得对水样中总菌数计数(如用 DAPI 染色)和活菌数计数 (CTC 染色) 可同时在荧光显微镜下进行。④CTC 法可用于不透明物体表面活菌数的测定。

3. 应用范围: INT 还原直接计数法可广泛用于包括海水<sup>[29]</sup>、淡水<sup>[9]</sup>及生活污水<sup>[26]</sup>等在内的多种水环境样品中具有代谢活性的细菌计数。实验表明, 该方法不失为一种快速、简便的活菌计数法, 其所得水体中活菌计数值远远高于平板培养法。许多学者对 INT 法和 DVC 法对不同水体中活菌计数结果进行了比较研究。在对淡水样品的计数中, 两种方法所得活

菌数占总菌数(AODC法)比例没有明显差异<sup>[9]</sup>。但在有些海水样品中,可出现INT法计数值高于DVC法<sup>[29]</sup>。将DVC法和INT法结合在一起检测自然水体中活菌数,并不比单独使用这些方法所得计数值高。实验发现,有些伸长、变粗的菌体中没有出现INT甲腊斑点;同样,并非所有胞内有红色斑点的细菌都伸长、变粗<sup>[9,16]</sup>。

INT法也已被用于细菌活的非可培养状态的检测<sup>[33,34]</sup>。另外,INT法及CTC法还可用于杀菌物质的有效浓度测定<sup>[32]</sup>及抗菌素效价的测定。

#### (四) 荧光显微计数方法的扩展

近年来,有人将上述荧光显微计数法与其它计数方法相结合,扩展了荧光显微技术的应用领域,推动了该技术的发展。荧光抗体染色技术(FA)及其在医学、生物学中的应用已有大量文献报道<sup>[35]</sup>,本文不再叙及。通过荧光抗体染色技术可以较准确地计数样品中某种细菌(或其特定血清型),但FA方法不能区分活菌与表面抗原尚完整的死菌。而FA技术与上述活菌计数法的结合可以快速而准确地测定样品中某种细菌(或其特定血清型)的活菌数,这在预防医学及卫生防疫领域尤为重要。Brayton等<sup>[36]</sup>使用经荧光素标记的单克隆抗体结合DVC技术(FA-DVC)检测孟加拉霍乱流行区河水、井水及池塘水中的霍乱弧菌01型。在所测16个样品中,常规培养法(MPN法)只检出1例为阳性。而以FA法测得所有被检水样中,霍乱弧菌01型占总细菌数的0.01—0.1%。FA-DVC法证明,其中16—85%是活的。Desmonts等<sup>[37]</sup>应用间接荧光抗体与活菌直接计数法(IFA-DVC)检测污水处理厂污水中的沙门氏菌。以培养法(MPN法)检测8个未经处理的污水样品,其中4个检出沙门氏菌。另外4个加氯消毒的排出水样品中只有1个是阳性结果。而IFA法检测这12个污水样品均为阳性。IFA-DVC法表明未处理污水中IFA计数的19.4—62.9%是活的,如氯消毒的污水排出水中IFA计数的5—31.5%是活菌。IFA-

DVC法对沙门氏菌的计数值高于MPN法10—100倍。Vesey等<sup>[38]</sup>应用IFA-INT法对431个环境样品中*Legionella pneumophila*血清1型的检测结果表明,所测样品中100个为IFA阳性,其中具有还原INT能力的为50%。以培养法只检出33个样品中含*Legionella* spp.,其中,17个为*Legionella pneumophila*血清1型阳性,这17个样品均为IFA-INT阳性。上述研究结果表明,许多人类病原菌一旦进入环境,即大部分变成活的非可培养状态,常规培养法无法将其检测出来。应用IFA-DVC或IFA-INT技术可以准确地检出环境样品中特定的活的人类病原菌。无疑,这为预防医学和卫生防疫部门提供了一种新的、快速、简便、可靠的检测手段。

#### 参 考 文 献

- Jannasch HW & GE Jones: *Limnol. Oceanogr.*, 4: 128—139, 1959.
- Van Es FB & L-A Meyer-Reil: In KC Marshall (ed.) *Adv. Microbial Ecol* 6: 111—170. Plenum Press, New York, 1982.
- Francisco DE et al: *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 92: 416—421, 1973.
- Zimmermann R & L-A Meyer-Reil: *Kieler Meeresforsch.*, 30: 24—27, 1974.
- Daley RJ & JE Hobbie: *Limnol. Oceanogr.*, 20: 875—882, 1975.
- Hobbie JE et al: *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 1225—1228, 1977.
- Roberts RD & LM Sephton: *J. Limnol. Soc. South Africa*, 7: 72—74, 1981.
- McFeters GA et al: *J. Microbiol. Methods*, 13: 87—97, 1991.
- Quinn JP: *J. Appl. Bacteriol.*, 57: 51—57, 1984.
- Maki JS & CC Remsen: *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 1132—1138, 1981.
- Beech IB & CC Gaylarde: *J. Appl. Bacteriol.*, 67: 201—207, 1989.
- Ferguson RL & AV Palumbo: *Limnol. Oceanogr.*, 24: 697—705, 1979.
- Sieracki ME et al: *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 799—810, 1985.
- Bjornsen PK: *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 1199—

- 1204, 1986.
15. Nagata T et al; *Bull. Jap. Soc. Microbiol. Ecol.*, **4**: 89-99, 1989.
16. Kogure K et al; *Can. J. Microbiol.*, **25**: 415-420, 1979.
17. Kogure K et al; *Arch. Hydrobiol.*, **102**: 117-122, 1984.
18. Peele ER & RR Colwell; *Can. J. Microbiol.*, **27**: 1071-1075, 1981.
19. 许兵, 徐怀恕; 青岛海洋大学学报, **22**: 53-56, 1992.
20. 徐怀恕, RR Colwell; 青岛海洋大学学报, **19**: 77-83, 1989.
21. 许屏; 荧光和免疫荧光染色技术及应用, p. 1-15, 人民卫生出版社, 北京, 1983.
22. Kogure K et al; *Can. J. Microbiol.*, **26**: 318-323, 1980.
23. Roszak DB & RR Colwell; *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 2889-2903, 1987.
24. Kogure K et al; *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 2332-2337, 1987.
25. 纪伟尚等; 微生物学通报, **17**: 362-364, 1990.
26. Zimmermann R et al; *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**: 926-935, 1978.
27. Betts RP et al; *Letters in Appl. Microbiol.*, **9**: 199-202, 1989.
28. Tabor PS & RA Neihof; *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 1249-1255, 1982.
29. Tabor PS & RA Neihof; *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**: 1012-1019, 1984.
30. Bitton G et al; *Stain Technol.*, **58**: 343-346, 1983.
31. Dutton RJ et al; *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 1263-1267, 1983.
32. Rodriguez GG et al; *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1801-1808, 1992.
33. Oliver JD & D Wanucha; *J. Food Saf.*, **10**: 79-86, 1989.
34. Oliver JD et al; *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 2640-2644, 1991.
35. Ben Bohloul B & EL Schmidt; In M Alexander (ed.) *Adv. Microbiol. Ecol.*, **4**: 203-241, Plenum Press, New York, 1980.
36. Brayton PR et al; *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 2862-2865, 1987.
37. Desmonts C et al; *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 1448-1452, 1990.
38. Vesey C et al; *Letters in Appl. Microbiol.*, **10**: 113-116, 1990.

(1992-6-24 收稿)