

生物发光法测定天然水体细菌数量中游离ATP的去除*

王佳欣 崔璐璐 谢冰**

华东师范大学生态与环境科学学院, 上海市城市化生态过程与生态恢复重点实验室 上海 200241

摘要 天然水体中存在浮游动植物等体细胞和游离ATP, 会对细菌ATP的测定产生严重的干扰, 所以探究体细胞和游离ATP的消除方法是生物发光法测定细菌总数中不可缺少的预处理步骤. 本文研究了体细胞提取剂Tritonx-100的最适浓度和最适提取时间, 游离ATP水解酶apyrase的最适浓度和对细菌ATP测定的影响, 并将包含Tritonx-100和apyrase酶的体细胞排除体系应用于实际天然水体细菌数量的测定. 结果显示, 0.4%的Tritonx-100作用水样2 min能够有效提取水样中的体细胞; Apyrase酶浓度达到0.2 U时能够有效水解水样中的游离ATP; Apyrase酶的加入对细菌无水解作用, 对细菌ATP的测定无明显影响; 包含Tritonx-100和apyrase酶的体细胞排除体系能够裂解体细胞而不会对细菌ATP的测定造成显著影响; 应用于实际天然水体的结果也表明, 体细胞排除体系可为ATP生物发光法准确测定环境样品中的细菌数量创造条件. 本研究表明, 经Tritonx-100和apyrase酶处理后, 基本能够排除体细胞和游离ATP的干扰, 得到天然水体中的实际细菌总数. 图3 表3 参17

关键词 ATP生物发光法; Tritonx-100; apyrase; 体细胞ATP; 游离ATP
CLC Q93-3 : X832

ATP bioluminescence for determining total bacteria in natural water to remove free ATP*

WANG Jiaxin, CUI Lulu & XIE Bing**

Key Laboratory for Urban and Ecological Restoration of Shanghai, School of Ecology and Environmental Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China

Abstract ATP bioluminescence is a simple, highly sensitive, and real-time monitoring assay to detect the total number of bacteria in sample. However, other forms of ATP in natural water usually interfere with determination of bacterial ATP. Therefore, how to eliminate other body cells and free ATP is an important preprocessing step in bioluminescence method. This research investigated the optimal concentration and the extraction time of body cell extraction agent (Triton-100). Meanwhile, we also studied the optimal free ATP hydrolase (apyrase) concentration and its effect on bacterial ATP assay, which was also applied to the bacteria counts in the natural waters (body cell-free) system containing Tritonx-100 and apyrase. The result showed that using 0.4% of Tritonx-100 could effectively extract body cells in 2 minutes and 0.2 U apyrase could effectively hydrolyze body cells in water samples. In addition, adding apyrase to samples did not hydrolyze bacteria and had no effect on the bacterial ATP measurement. The body-cell-free system with Tritonx-100 and apyrase could decompose body cells and had no significant impact on the bacterial ATP measurement. Besides, the practical application also proved that this system accurately detected the number of bacteria in environmental samples by ATP bioluminescence method. Therefore, by treating natural water with Tritonx-100 and apyrase, body cells and free ATP can be completely eliminated, leading to actual bacteria counts in natural water.

Keywords ATP bioluminescence; Tritonx-100; apyrase; cells ATP; free ATP

对于一定生理时期内的活体微生物, 其ATP含量较为恒定, 细菌中ATP量与细菌量成正比. 当细胞受损或死亡时, 其ATP值会迅速下降或消失, 不会对活体微生物的测定产生

影响^[1]. ATP生物发光法即是利用生物发光技术测定细菌中ATP含量, 根据细菌量正比于ATP量, 从而推算出活菌总数^[2]. ATP生物发光法是一种快速检测水中微生物的方法, 相比较传统平板计数法^[3], 具有省时、简便、灵敏度高和可实时监测等优点^[4-7].

由于环境的复杂性, 样品中可能存在非细菌ATP和其他成分的干扰, 主要是其中的浮游动植物等体细胞和游离ATP会使得测定值偏高. 目前, 作为排除体细胞及游离ATP

收稿日期 Received: 2014-03-03 接受日期 Accepted: 2014-05-26

*国家自然科学基金项目(31370510)和上海市科委项目(1352-0720600)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370510) and the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (13520720600)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: bxie@ecnu.edu.cn)

含量的前处理方法,有用滤膜过滤样品,洗去干扰性ATP的方法,但这一方法不能把干扰性ATP全部滤去^[8]。1986年Stanly应用非离子和阳离子试剂选择性地各自提取体细胞ATP和细菌ATP被认为是ATP发光技术的一个重大进展。Lundin and Thore研究不同提取剂对体细胞的提取效果,发现Tritonx-100提取效果最好^[9-10]。Apyrase酶最先是Meyerhor在1945年提出,用于描述一种酵母酶,此酶能水解ADP和ATP的焦磷酸键^[11]。Tritonx-100和apyrase酶较多地用于农业、医学、生物学以及食品领域的研究^[12-13]。对于天然水体中的体细胞和游离ATP的去除,鲜少有人研究,本研究采用Tritonx-100和apyrase酶以及选择相关条件,建立天然水体处理中体细胞排除体系,旨在寻找环境样品中体细胞和游离ATP去除的最适条件。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Tritonx-100、ATP、apyrase酶、苯扎溴铵、BacTiter-Glo™试剂盒均购自promega公司(美国)。大肠杆菌菌种、金黄色葡萄球菌菌种由本实验室保藏。

1.2 ATP发光强度测定

(1) ATP标准曲线的制作:在测定玻璃管中加入20 μL 一定浓度(10^{-9} - 10^{-15} mol/mL)的ATP标准溶液和20 μL 苯扎溴铵,轻轻摇晃混匀后破壁1 min,移取20 μL 破壁后的ATP试剂于平行测定玻璃管中,每支玻璃管中加入280 μL 的酶液,迅速盖上样品室的盖子,测量发光强度;空白值为20 μL 灭菌的生理盐水的发光值。

(2) 样品发光强度的测定:用20 μL 待测样品取代ATP标准溶液重复上述步骤,样品破壁时间为3 min。

1.3 不同浓度的Tritonx-100和提取时间对体细胞提取效果的影响研究

取1 mL的 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值为0.102的苹果匀浆液,分别加入1 mL 0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%浓度的Tritonx-100,轻轻振荡混合2 min后立即测定体细胞发光强度。

取1 mL的 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值为0.102的苹果匀浆液,加入1 mL 0.4%浓度的Tritonx-100,轻轻振荡混合均匀,分别于作用时间为30 s、45 s、60 s、75 s、90 s、105 s、120 s、135 s时测定发光强度。

1.4 Apyrase酶使用浓度研究

取1 mL 10^{-9} mol/mL浓度的ATP标准溶液,分别加入0.025 U、0.05 U、0.1 U、0.15 U、0.2 U、0.25 U的apyrase酶,对照组为加入缓冲液,30 $^{\circ}\text{C}$ 保温10 min,立即100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴1 min后测定发光强度,以剩余发光强度表示apyrase酶对ATP的水解效果。

1.5 Apyrase酶对细菌是否水解的研究

取6份等体积(1 mL) $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值为0.006的大肠杆菌菌液,分别加入0.02 U、0.025 U、0.05 U、0.1 U、0.15 U、0.2 U的apyrase酶。置于30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下温育10分钟,然后立即于100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴1分钟。测定菌液发光强度,对照组为不加apyrase酶处理的菌液。

1.6 验证体细胞排除体系是否对细菌数量产生影响

(1) 体细胞和游离ATP去除的方法:取1 mL水样,加入

1 mL 0.4%浓度的Tritonx-100提取体细胞,轻轻振荡混合均匀,作用2 min,立即加入0.2 U的apyrase酶于30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min用于水解体细胞和游离ATP,然后于100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴1 min使该酶失活,对接下来的细菌ATP测定不会产生干扰。

(2) 将已知浓度的大肠杆菌菌液与苹果匀浆液按1:1体积比混合均匀,加入Tritonx-100,轻轻振荡提取2 min,向样品中加入0.2 U的apyrase酶,30 $^{\circ}\text{C}$ 温育10 min后测定菌液发光强度,并与体细胞处理前的菌液发光强度比较。

1.7 应用于不同类型水体的细菌数量测定

(1) 采样与样品处理:水样取自天然水体——丽娃河、银锄湖、苏州河。丽娃河位于华东师范大学校园;银锄湖是位于上海长风公园的景观水体,由于水体封闭且受游人活动的影响,属轻度污染;苏州河是黄浦江的支流,水体曾经受到严重的污染,目前在恢复之中^[14]。上述水样采集后立即置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内放置,尽量减少水样中微生物及ATP含量因温度变化而产生的变化。样品分析时将采集的水样放于摇床振荡约15 min,使细菌分散均匀,将水样稀释成所需浓度备用。若水样含颗粒物及丝状物杂质较多,用2 μm 的醋酸纤维素酯膜过滤,去除杂质干扰。

(2) 3种不同类型的水体本底发光强度测定:用0.22 μm 混合纤维素酯膜过滤,将水样中的绝大多数细菌、藻类及浮游动物等截留在膜的表面,在不加荧光素酶的条件下直接测定滤液的发光强度即为水体本底发光值。3种水体水样的本底发光测定值范围在99-264之间,将水体在室温条件下放置30 min后,再次测发光强度得到的值的范围为54-72,发光值较小,对发光测定不会造成太大干扰。

1.8 涂布平板菌落总数测定方法

涂布平板法按照中华人民共和国国家标准食品卫生微生物学检验菌落总数方法(GB/T4789.2-2003)测定^[15]。

1.9 数据处理

所有数据均利用SPSS17.0进行统计分析,数据的差异性分析中 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P > 0.05$ 为不显著。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的Tritonx-100和提取时间对体细胞提取效果的影响

利用浓度分别为0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%的Tritonx-100提取 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值为0.102的苹果匀浆液,提取效果见图1。由体细胞发光值可看出,不同浓度的Tritonx-100对体细胞提取效率不同,随着Tritonx-100浓度的增大,体细胞发光值呈现先增后降的趋势,且Tritonx-100浓度为0.4%时提取出的体细胞发光值最大。因此本研究选取最适的Tritonx-100浓度为0.4%。

Tritonx-100作用于样品需要一定的时间才能达到提取体细胞的目的,这与体细胞混合时间以及提取效率有关,而被提取出的ATP的降解速率也与时间有关,因此,每次生物发光测试中加入Tritonx-100的时间与加入荧光素酶的时间间隔保持一致,以免影响结果的重复性。

0.4%的Tritonx-100提取体细胞ATP的效果随时间变化的趋势见图2。由图中数据可以看出,体细胞ATP的相对发光强度

随时间呈现先增后降的趋势, 相对发光强度于120 s即2 min时达到最大, 因此将Tritonx-100的最佳提取时间确定为2 min.

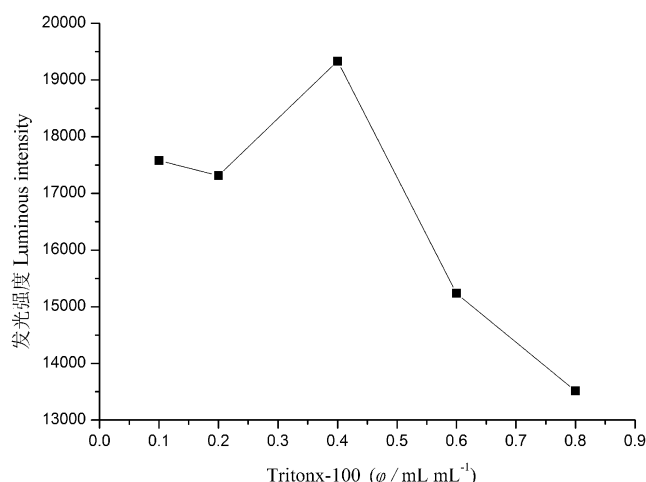


图1 不同浓度的Tritonx-100对体细胞的提取效果。
Fig. 1 Effects of Tritonx-100 concentration on exaction of body cells.

2.2 apyrase酶的使用浓度

将不同单位的酶作用于 10^{-9} mol/mL的ATP标准溶液, 以ATP生物发光法检测剩余ATP含量, 结果如图3. Apyrase酶可以作为体细胞和游离ATP的水解酶, 但是酶浓度不同, 作用效果也是不一样的, 酶浓度过低, 起不到水解作用, 或者无法完全水解水体中的体细胞和游离ATP, 会使细菌ATP的发光值偏高. 由图3可以看出, 随着酶浓度的增加, 剩余发光强度逐渐下降, 当酶达到0.2 U时, 剩余发光强度几乎降为零, 说明该浓度的酶能够完全作用于 10^{-9} mol/mL的ATP标准溶液并能使之水解完全. 而本研究使用的几种不同水样的发光值都小于 10^{-9} mol/mL的ATP标准溶液对应发光值, 因此, 采用0.2 U的apyrase酶作为本研究中微生物体外ATP清除剂.

2.3 Apyrase酶对细菌的水解

Apyrase酶对细菌水解的影响见表1. 由表中数据看出, 体系未加入apyrase酶时菌液发光强度为21 184, 加入后的菌液发光强度在21 098-23 985之间波动, 与体系未加入apyrase酶时菌液发光强度差别很小 ($P > 0.05$, t -test), 加入酶前后的菌液发光强度无显著差异, 表明apyrase酶对细菌ATP的测定无明显干扰. 说明细菌提取剂和体细胞提取剂不同, 且apyrase酶只水解游离态的ATP, 对于未破壁的细菌不能水解, 进一步说明了apyrase酶对细菌ATP的测定无明显影响.

表1 Apyrase酶对细菌水解的影响

Table 1 Effect of apyrase concentration on bacteria hydrolysis

Apyrase酶的浓度 Concentration of apyrase (A/U)		0	0.02	0.025	0.05	0.1	0.15	0.2
菌液发光强度 Bacterial luminous intensity		21184	21098	23149	22878	23985	22532	21154

2.4 体细胞排除体系对细菌数量的影响

大肠杆菌和苹果匀浆液混合液经体细胞排除体系处理

前后的菌液发光强度对比结果见表2. 由表可知, 混合液经体细胞处理后的菌液发光强度与处理前大肠杆菌菌液发光强度相比无显著变化 ($P = 0.313 > 0.05$, t -test), 说明体细胞去除体系能够裂解体细胞而不会对细菌发光强度造成显著影响.

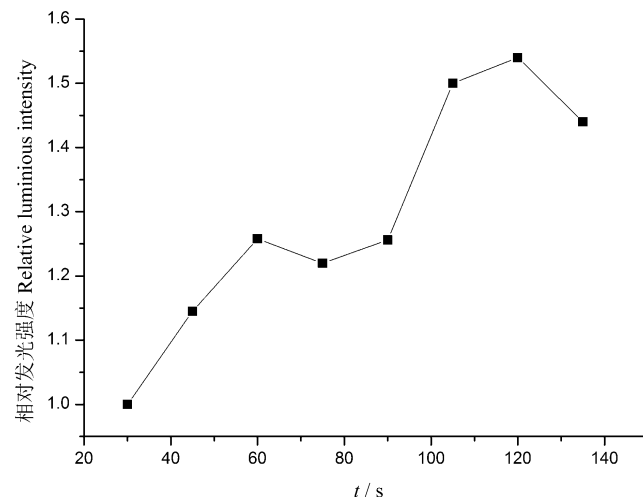


图2 体细胞提取率随时间变化趋势。
Fig. 2 Effects of time on exaction of body cells.

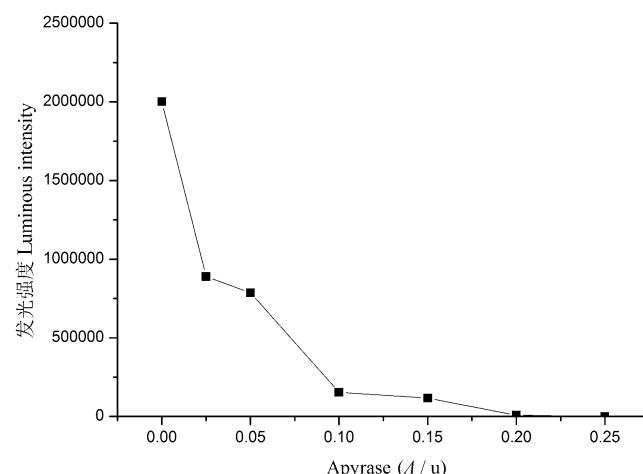


图3 不同浓度的apyrase酶水解ATP的效果。
Fig. 3 Effects of apyrase concentration on ATP hydrolysis.

表2 体细胞处理前后菌液发光强度

Table 2 Luminous intensity before and after body cell treatment

$D_{600\text{ nm}}$	大肠杆菌菌液发光强度 Escherichia coli luminous intensity	大肠杆菌和苹果匀浆液经体细胞处理后的菌液发光强度 Luminous intensity of Escherichia coli and apple homogenate treated with triton-100 and apyrase
0.006	15272	13686
0.008	24758	23737
0.024	53937	41107

2.5 不同类型水体的细菌数量

体细胞和游离ATP排除前后的水体总发光值以及与实际平板数量的关系见表3. 由表可知, 体细胞和游离ATP未排除时3个水体的总发光强度分别为 10^4 数量级, 体细胞和游离

ATP排除后为10³数量级. 由体细胞和游离ATP排除前后的水体总的发光强度之差可知水体中的体细胞和游离ATP的发光强度比例分别是53.2%、54.9%、36%, 在总体发光值中所占比重很大.

由水体总的发光强度和细菌标线可以得到水体中的总细菌数. 体细胞和游离ATP未排除时3个水体的总细菌数由ATP法得到的分别是6.14×10⁶、6.61×10⁶、5.56×10⁶ cfu/mL, 体细胞和游离ATP排除后3个水体的总细菌数由ATP法得到的分别是1.50×10⁵、1.73×10⁵、1.89×10⁵ cfu/mL. 平板计数法得到的结果分别是5.64×10⁴、7.76×10⁴、7.88×10⁴ cfu/mL. 可以看出排除体细胞和游离ATP的水体总细菌数要低于排除体细胞和游离ATP前一个数量级, *t*-test检验 $P < 0.05$, 说明体细胞和游离ATP排除前后总细菌数差异明显, 体细胞和游离ATP会严重影响总细菌ATP的测定. 平板培养法得到的细菌总数低于排除后得到的结果, 这可能跟某些细菌无法培养有关.

表3 3种不同类型水体细菌数量测定结果

Table 3 Bacteria counts of three types of water bodies

测试指标 Test item	丽娃河 Liwa Creek	银锄湖 Yingcu Lake	苏州河 Suzhou Creek
未排除体细胞和游离ATP的水体总发光强度 Luminous intensity before body cell and free ATP removal	1.68 × 10 ⁴	1.90 × 10 ⁴	1.41 × 10 ⁴
按细菌标线得到的细菌数(<i>n</i> /cfu mL ⁻¹) Bacteria counts from the standard curve	6.14 × 10 ⁶	6.61 × 10 ⁶	5.56 × 10 ⁶
体细胞和游离ATP排除后发光强度 Luminous intensity after treated with triton-100 and apyrase	7.85 × 10 ³	8.54 × 10 ³	9.01 × 10 ³
按细菌标线得到的细菌数(<i>n</i> /cfu mL ⁻¹) Bacteria counts from the standard curve	1.50 × 10 ⁵	1.73 × 10 ⁵	1.89 × 10 ⁵
体细胞和游离ATP的发光强度 Luminous intensity of body cells and free ATPs	8.93 × 10 ³	1.04 × 10 ⁴	5.07 × 10 ³
体细胞和游离ATP所占的比率 Proportion of body cells and free ATPs	53.2%	54.9%	36%
平板计数法结果(<i>n</i> /cfu mL ⁻¹) Plate count result	5.64 × 10 ⁴	7.76 × 10 ⁴	7.88 × 10 ⁴

3 讨论与结论

以上实验研究表明, 0.4%的Tritonx-100作用水样2 min能够有效提取水样中的体细胞, apyrase酶活性达到0.2 U时能够完全作用于10⁻⁹mol/mL的ATP标准溶液并能使之水解完全. 因此, 采用0.4%Tritonx-100作为本研究中的体细胞提取剂, 0.2 U的apyrase酶作为本研究中微生物体外ATP清除剂. Apyrase酶对细菌ATP的测定无明显的干扰作用, 细菌ATP提取剂和体细胞ATP提取剂不一样, 且apyrase酶只水解游离态的ATP, 对于未破壁的细菌不能水解.

体细胞排除体系结合ATP生物发光法应用于天然水体测定, 发现天然水体排除体细胞和游离ATP后, 与未排除相比, 发光强度极显著降低, 说明测定天然水体细菌数量时, 若水体中含有浮游动植物等体细胞和游离ATP, 会对细菌

ATP测定造成严重干扰, 因此对水体测定之前先要排除体细胞和游离ATP的干扰. 毛映丹对丽娃河、银锄湖和苏州河的水样进行浮游生物计数, 其中浮游动植物数量在10⁴-10⁶个/L水平^[16]. 浮游动植物等体细胞对ATP生物发光法测定天然水体中细菌总数会产生比较大的影响. 陈磷等对2005和2006苏州河的异养细菌测定, 发现苏州河水中的异养细菌在10³-10⁴ cfu/mL水平, 用显微镜计数得到的活菌数有10⁶水平, 高于异养细菌2个数量级, 平板计数法得到的结果偏低, 说明水样中有大量细菌是不可培养的^[17], 本研究的结果也说明了这一点. 天然水体中体细胞和游离ATP会直接影响到ATP法菌数的测定, 需要消除, 同时体细胞排除体系能提高ATP发光法测定细菌数的精确性.

综上, 体细胞排除体系结合ATP生物发光法应用于天然水体测定, 使得ATP生物发光法测定天然水体活菌数量时, 得到的数据更趋准确和可信. ATP生物发光法操作过程简单, 耗时较短, 结果更真实反应水中活菌数量, 可为景观、江河和湖泊等水体的微生物快速监控提供有效方法, 具有良好的应用前景.

参考文献 [References]

- Holm-Hansen O, Booth CR. The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance [J]. *Limnol Oceanogr*, 1996, **11**: 510-519
- 连英姿, 董雪, 李勇, 李越, 安静, 李欣. ATP生物发光技术快速检测水中细菌的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, **17** (10): 1859-1860 [Lian YZ, Dong X, Li Y, Li Y, An J, Li X. Study on measuring rapidly bacterium in water with ATP bioluminescence technique [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2007, **17** (10): 1859-1860]
- 吴慧清, 李程思, 张菊梅, 吴清平. ATP生物发光法饮用水中细菌总数快速测定方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, **19** (9): 1975- 1979 [Wu HQ, Li CS, Zhang JM, Wu QP. Rapid detection of total bacterial amount in drinking water by ATP bioluminescent method [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2009, **19** (9): 1975- 1979]
- 唐倩倩, 叶尊忠, 王剑平, 盖玲, 应义斌, 李雁斌. ATP生物发光法在微生物检验中的应用[J]. 食品科学, 2008, **29** (6): 460- 464 [Tang QQ, Ye ZZ, Wang JP, Gai L, Ying YB, Li YB. Application of ATP bioluminescence in microbial detection [J]. *Food Sci*, 2008, **29** (6): 460- 464]
- 李春艳, 霍贵成, 王德国, 王福厚. ATP生物发光法快速测定生乳中微生物总数的研究[J]. 食品工业科技, 2008, **29** (7): 233- 238 [Li CY, Huo GC, Wang DG, Wang FH. Research on rapid detecting microbial count in raw milk with ATP bioluminescence [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2008, **29** (7): 233-238]
- 唐倩倩, 王剑平, 盖玲, 叶尊忠, 应义斌. ATP生物发光法检测*E. coli* O157:H7的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, **29** (2): 309- 312 [Tang QQ, Wang JP, Gai L, Ye ZZ, Ying YB. Study on detection of *E. coli* O157:H7 by ATP bioluminescence [J]. *Spectrosc Spectral Anal*, 2009, **29** (2): 309- 312]
- 侯英, 吴雪琼, 王兴华. ATP生物发光原理及应用研究[J]. 中国医药导报, 2010, **7** (12): 12-13 [Hou Y, Wu XQ, Wang XH. Research on

- bioluminescent theory and applying of ATP [J]. *China Med Herald*, 2010, **7** (12): 12-13]
- 8 李利霞, 常超, 伍金娥. ATP生物荧光法及其应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, **31** (9): 394-397 [Li LX, Chang C, Wu JE. Research progress in the bioluminescence assay and its applications [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2010, **31** (9): 394-397]
- 9 何艳. ATP生物发光法中ATP提取剂的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2007 [He Y. Study on ATP extractor in ATP- bioluminescence [D]. Shanghai: East China Normal University, 2007]
- 10 朱金国, 胡楚民. ATP生物发光法——一种新的快速微生物检测技术[J]. 现代商检科技, 1993, **3** (3): 52- 55
- 11 程远国, 吴厚永, 李德昌, 李成文, 赵彤言. 长角血蜱唾液腺Apyrase酶的生物学特性和功能的研究[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2000, **7** (3): 175-182 [Cheng YG, Wu HY, Li DC, Li CW, Zhao TY. Apyrase and anti-platelet activities from the salivary glands of *Haemaphysalis longicornis* [J]. *Acta Parasitol Med Entomol Sin*, 2000, **7** (3): 175-182]
- 12 Tan ZJ, Li XL, Turner RC, Logsdon AF, Lucke-Wold B, Dipasquale K, Jeong SS, Chen RD, Huber JD, Rosen CL. Combination treatment of r-tPA and an optimized human apyrase reduces mortality rate and hemorrhagic transformation 6 h after ischemic stroke in aged female rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, **738**: 368-373
- 13 Hamasaki R, Kato H, Terayama Y, Valenzuela JG. Functional characterization of a salivary apyrase from the sand fly, *Phlebotomus duboscqi*, a vector of *Leishmania major* [J]. *J Insect Physiol*, 2009, (55): 1044-1049
- 14 徐祖信. 河流污染治理规划理论与实践[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2003. 30-107 [Xu ZX. Planning theory and practice of river pollution control [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2003. 30-107]
- 15 GB/T4789.2-2003 食品卫生微生物学检验菌落总数测定[S]
- 16 毛映丹. ATP生物发光法检测水中细菌数的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2009 [Mao YD. Detection of biomass in water by ATP bioluminescence technique [D]. Shanghai: East China Normal University, 2009]
- 17 陈璘, 殷浩文, 周忠良. 改进的标准化呼吸法评估苏州河河水微生物自净能力[J]. 环境化学, 2007, **26** (2): 262-263