

烟草可培养内生细菌的分离及多样性分析

陈泽斌^{1,2} 夏振远^{1*} 雷丽萍¹ 陈海如²

(1. 云南省烟草农业科学研究院 云南 玉溪 653100)

(2. 云南农业大学 植物保护学院 云南 昆明 650201)

摘要: 采用稀释平板法, 从健康烟草的根、茎、叶组织中分离到 267 株内生细菌。利用细菌菌落表征性状和 16S rRNA 序列对这些分离物进行了多样性分析。通过数值分析比较了 8 个菌落形态表征性状, 以类平均连锁聚类法的方式进行聚类分析, 在 2.15 的水平上可分成 5 个聚类群和 56 个亚群。16S rDNA 序列系统发育分析表明 267 株分离物可分为 21 个类群。研究表明同一菌落形态类型的菌株在系统发育树中不一定聚为一类, 菌落形态分类与分子生物学方法分类结果不完全一致。经克隆测序分析表明, 这 267 株分离物分别与 GenBank 中 6 类细菌中的 21 个已知种相似性达到 98%–99%。其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)细菌是烟草可培养内生细菌的优势种群。

关键词: 烟草, 可培养, 内生细菌, 微生物多样性

Diversity of cultivable endophytic bacteria isolated from tobacco

CHEN Ze-Bin^{1,2} XIA Zhen-Yuan^{1*} LEI Li-Ping¹ CHEN Hai-Ru²

(1. Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Yuxi, Yunnan 653100, China)

(2. Plant Protection College, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract: 267 endophytic bacteria of tobacco were isolated from roots, stems and leaves by the method of grinding separation. A preliminary analysis was made on the diversity of the isolates by phenotypic characteristics and molecular classification methods based on partial 16S rDNA sequences, the analytical comparison was also made between them. 267 bacteria isolates were separated with 8 different phenotypic characteristics, and were grouped into 5 clusters and 56 subclusters at the level of 2.15 with numerical classified based on the unweighted pair group method with arithmetic averages algorithm, and they were clustered into 21 molecular groups based on partial 16S rDNA sequences. The results show that there are much more phenotypic types than molecular groups, phenotypic characteristics was not consistent with the results of molecular classification exactly. The result of sequence analysis of the 16S rDNA showed a 98%–99% homology with 21 species in the GenBank. The dominant bacterial groups of tobacco endophytic bacteria belong to Firmicutes, *Bacillus* genera.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30860017)

* 通讯作者: Tel: 86-877-2075039; 信箱: zyxia@yntsti.com

收稿日期: 2011-01-27; 接受日期: 2011-05-16

Keywords: Tobacco, Culturability, Endophytic bacteria, Diversity of microorganism

20世纪50年代至今,人们已经先后从番茄、棉花、富贵竹、辣椒、甜瓜、哈密瓜、柠檬、红树林、茶树、黄花夹竹桃、黄瓜、小麦、玉米、马铃薯和水稻等多种不同种类的植物中分离得到多种内生细菌^[1-3]。大量研究结果表明,植物内生细菌具有丰富的生物多样性,目前已经发现超过129种(隶属于54个属)的植物内生细菌^[4]。其中以假单胞菌、芽孢杆菌、肠杆菌以及土壤杆菌为优势种群^[5-6]。目前研究比较系统的植物有棉花、小麦和花生等。而对于烟草的相关研究主要集中在防病、促内生细菌的筛选及其机理方面,对于烟草内生细菌多样性的研究国内鲜见报道。

内生细菌的分类学研究是内生细菌多样性研究中必不可少的环节,能否对内生细菌进行正确的鉴定分类,特别是种内关系的鉴定分类,直接关系到能否正确揭示内生细菌的多样性和系统发育,目前内生细菌分类鉴定方法主要包括以其形态学或生理生化特征为依据的表型分类法和利用现代技术方法进行,如近年来发展起来的化学鉴定、数值分类法和分子生物学技术等。邓墨渊等^[7]认为,现阶段我国应用的植物内生细菌分类方法主要是表型分类法和分子生物学技术相结合进行分类的方法。

为了全面了解烟草可培养内生细菌的多样性,本实验室对烟草不同器官的内生细菌进行分离并鉴定,以表型分类法和分子生物学分类法对得到的267株分离物的多样性进行了比较分析,以获取其表型及种类组成特征,为下一步有益内生细菌的筛选和研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 样品的采集和处理

以烟草旺长期的根、茎、叶为试验材料,包括28个叶片样品、7个茎部样品和4个根部样品,样品采自云南省玉溪市,采样时间为2009年7月上旬,烟草品种为K326。采样时选择生长性状良好、无病害症状的健康植株。样品从植株分离后立即放入无菌样品袋中,低温保鲜,在24h之内进行内生细菌的分离。

1.2 培养基及主要试剂

内生细菌分离和培养用NA培养基^[8]、液体培养用LB,内生细菌DNA提取、16S rDNA片段扩增所用的各种酶、Marker、dNTPs、Buffer等试剂为宝生物工程(大连)产品,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 烟草材料表面灭菌及效果检验

将烟草的根、茎、叶分别用自来水冲洗干净后,随机称取0.4g,先在70%酒精中振荡浸泡1min,再用有效氯含量1%的次氯酸钠溶液振荡浸泡1-5min,无菌水冲洗4次。将最后一轮的冲洗水涂布NA平板,以无菌水冲洗但未经消毒剂处理的材料为对照,28℃培养48h后记录菌落数,检测组织表面是否带菌,计算表面除菌率。表面除菌率=(未经消毒剂处理的材料表面细菌数-消毒剂处理后的材料表面细菌数)/未经消毒剂处理的材料表面细菌数×100%^[9]。

1.4 内生细菌的分离

取经检验表面灭菌彻底的材料0.4g,与一大一小灭菌钢珠一并放入2mL灭菌离心管中,加入600μL无菌水,用QIAGEN高通量组织研磨器研磨3min,频率为30r/s。研磨后的汁液梯度稀释10-10⁴倍,各取200μL匀浆液涂NA平板,每处理重复4次。28℃黑暗培养48h后根据菌落形态、颜色等不同挑取单菌落,重新于NA平板上划线纯化,挑取划线培养的单菌落移入NA试管斜面保存。

1.5 表型特征的统计及聚类分析

根据菌落的形状、大小、边缘特征、干湿、颜色、质地、表面光滑与否和透明度8个指标对菌落形态进行初步归类^[10],并将结果按照表1进行编码后输入计算机,去除全同性状,对于菌落形态完全相同的菌株则只选取1株作为代表菌株,用DPS 7.05版按类平均连锁聚类法进行系统聚类分析,得出表型特征的数值分类聚类图。

1.6 内生细菌的16S rRNA序列分析

用TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Ver.2.0提取全部分离物的细菌基因组DNA,方法参见试剂盒说明书。PCR反应

体系(50 μL)组成: 10 \times PCR Buffer 5 μL , dNTPs (10 mmol/L) 4 μL , 引物 F27/R1492^[11] (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 2 μL , 模板 DNA (约 50 g/L) 1 μL , *Taq* 酶 2.5 U, 双蒸水 35.5 μL 。PCR 扩增按 Sambrook 方法^[12]进行。扩增产物经 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 回收后, 连接于载体 pMD18-T Vector (TaKaRa), 转化入感受态细胞 *E. coli* DH5 α , 挑取白色菌落以 M13F/M13R 为引物进行菌落 PCR 鉴定。阳性克隆委托上海英骏生物技术有限公司进行序列测定, 通过 BLAST 寻找与目的序列同源性最高的已知分类地位菌种的 16S rRNA 序列进行比较鉴定, 通过 MEGA 5.0 进行比对, 随后选用 Maximum Composite Likelihood 距离模型进行 UPGMA 分析生成系统发育树, 发育树用 Bootstrap 法(100 次重复)检验。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离

一共从烟草的根、茎、叶中分离纯化得到内生细菌 267 株(图 1), 其中 42 株分离自根部, 32 株分离自茎部, 193 株分离自叶片(表 2)。表面灭菌效果检验表明(表 3), 用 1% NaOCl 进行表面灭菌时, 烟草不同器官所需灭菌时间有差异。其中根部样品经 5 min 灭菌处理后除菌率才能达到 100%, 叶片仅需 1 min 表面除菌率便可达到 100%, 茎需要 3 min 可达到 100%。这与烟草各器官的组织致密性及所处生长环境有关。考虑到消毒时间过长, 消毒剂渗入可能会杀死部分内生细菌, 对内生细菌的多样性研究有影响, 因此, 本文采用能使除菌率达到 100% 的最短灭菌时间, 即叶片 1 min、茎 3 min、根 5 min。

表 1 细菌聚类分析特征

Table 1 The clustering analytical characteristic table of bacteria

序号 The number of each character	性状 Characters	描述-编码 Description-Number
1	形状	点状-1; 圆形-2; 不规则形, 水渍状-3; 不规则形-4; 不规则形, 线状-5; 圆形, 水渍状-6
2	大小	数值 单位: mm
3	干湿	干-1; 湿-2; 湿, 粘稠-3
4	颜色	黄色-1; 乳白色-2; 米黄-3; 白色-4; 浅黄-5; 乳黄-6; 粉红-7
5	质地	有光泽-1; 无光泽-0
6	表面	凸起-0; 扁平-1; 凹凸不平-2; 扁皱-3; 内凹-4
7	边缘	整齐-0; 不整齐-1
8	透明度	透明-0; 不透明-1; 半透明-2

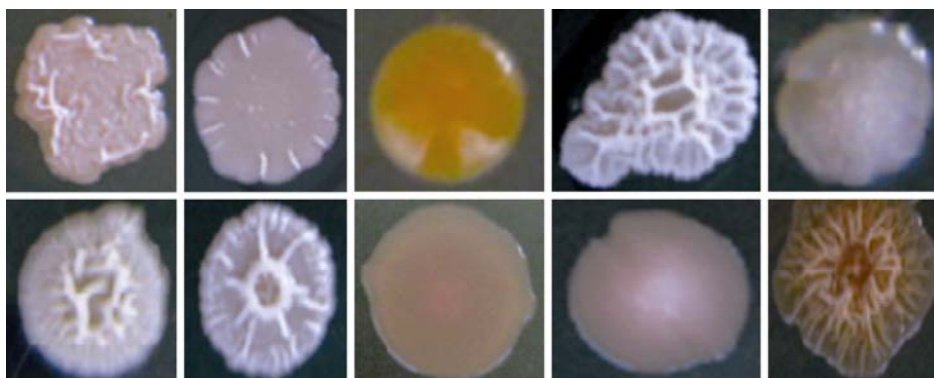


图 1 培养 48 h 的部分菌落实体照片

Fig. 1 Picture of some colonies of tobacco endophytic bacteria

注: 显示菌落的形态差异, 未显示菌落大小。

Note: These pictures mainly display the morphological variation of the bacteria colonies and do not show the size of them.

表 2 烟草内生细菌的种类及分布
Table 2 The species and distribution of tobacco endophytic bacteria

种类 Species		菌株数目 Number of strains	序列相似性 Sequence similarity	各部位分离株数 Number of isolates from different parts		
门、纲 Phylum and Class	属、种 Genus and Species			根 Root	茎 Stem	叶 Leaf
Firmicutes	<i>Bacillus pumilus</i>	132	98%–99%	22	17	93
	<i>Bacillus subtilis</i>	4	99%	2	0	2
	<i>Bacillus simplex</i>	6	99%	2	0	4
	<i>Bacillus aquimaris</i>	3	99%	0	0	3
	<i>Bacillus cereus</i>	57	99%	4	8	45
	<i>Bacillus clausii</i>	1	99%	1	0	0
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	23	99%	3	3	17
	<i>Paenibacillus lautus</i>	2	98%–99%	0	0	2
	<i>Paenibacillus pabuli</i>	2	98%–99%	0	0	2
	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	1	99%	0	0	1
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	3	99%	1	0	2
	<i>Enterobacter ludwigii</i>	1	99%	0	0	1
	<i>Serratia proteamaculans</i>	4	99%	0	0	4
	<i>Pseudomonas gessardii</i>	1	99%	0	1	0
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7	99%	1	3	3
Actinobacteria	<i>Arthrobacter luteolus</i>	3	99%	0	0	3
α -Proteobacteria	<i>Pseudochrobactrum kiredjianiae</i>	1	99%	0	0	1
β -Proteobacteria	<i>Alcaligenes faecalis</i>	6	99%	1	0	5
	<i>Achromobacter</i> sp.	1	99%	0	0	1
γ -Proteobacteria	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	8	99%	5	0	3
Bacteroidetes	<i>Myroides odoratus</i>	1	98%	0	0	1

表 3 各组织不同表面消毒时间的除菌率
Table 3 The rate of sterilization from different disinfection time of different tissue sample

样品 Sample	消毒时间 Disinfection time (min)				
	1	2	3	4	5
叶 Leaf	100%	100%	100%	100%	100%
茎 Stem	85%	94%	100%	100%	100%
根 Root	64%	74%	82%	92%	100%

2.2 表型特征的统计及聚类分析

从表型特征的数值分类聚类图来看, 这 267 株分离物的表型具有丰富的多样性(图 2)。在欧氏距离为 2.15 时可聚为 5 个表观群, 在欧氏距离为 1.00 时可聚为 56 个亚群(表 4)。

2.3 内生细菌的 16S rRNA 序列分析

经过克隆测序获得了全部 267 株内生细菌的

16S rRNA 序列, 由于细菌分离物数量庞大, 只在表型特征的数值分类聚类中得到的 56 个亚群中各选取 1 个分离物作为代表性分离物进行了系统发育分析(图 3)。结果发现依据 16S rRNA 序列的聚类结果与依据细菌菌落形态的数值聚类结果不完全一致, 如 SCA1、SCA2、SCA3 按照数值分类为一个单独的表观群, 但在 16S rDNA 系统发育树上 SCA1 却没有与 SCA2、SCA3 聚为一个类群, 说明菌落形态相近的细菌分离物亲缘关系可能会较远, 同时, 多个菌落形态类型细菌被基于 16S rRNA 序列的系统发育树聚为一个类群, 如 Bac 类群, 其中包括了分布于 5 个表观群中的某些亚群, 这说明亲缘关系很近的分离物在菌落形态上也会表现一定的差异。

通过 GenBank 的 BLAST 程序对 267 株内生细菌的 16S rRNA 测序结果进行相似性比对, 鉴定细

表 4 各表观群中细菌的主要菌落形态及在分离总株数中所占比例
Table 4 The colonial morphology of isolates in five apparent groups and their proportion

表观群 Apparent group	包含的亚群 Subcluster	菌落形态 Colonial morphology	分离株数 Number of isolates	所占比例 Proportion
SCA	SCA1-SCA3	多为圆形、直径 2 mm、粘稠、白色、有光泽、表面凸起、边缘整齐、半透明	25	9.4%
SCB	SCB1-SCB23	主要为圆形、点状、湿、浅黄、表面凸起、边缘整齐、半透明	98	36.7%
SCC	SCC1-SCC10	形状以圆形、点状为主, 颜色以白色和浅黄为主, 表面无光泽	53	19.8%
SCD	SCD1、SCD2	多为不规则形、线状、干、乳白色、有光泽、凸起、边缘整齐、半透明	11	4.1%
SCE	SCE1-SCE18	主要为白色、表面凹凸不平	80	30.0%

菌的种类。发现 267 株分离物与已知分类地位物种的 16S rRNA 序列相似性都大于 97% (表 2), 大部分分离物与核酸数据库中的已知菌株之间相似性甚至达到了 98%–99%。这 267 株分离物分属厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、 α -变形菌纲(α -Proteobacteria)、 β -变形菌纲(β -Proteobacteria)、 γ -变形菌纲(γ -Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes) 6 大类细菌, 分别与数据库中已知的芽孢杆菌属(*Bacillus*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、假苍白杆菌属(*Pseudochrobastrum*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、窄食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、香味菌属(*Myroides*) 中细菌的 16S rRNA 具有较高的相似性。其中属于厚壁菌门的有 247 株, 大多数与芽孢杆菌属关系密切(相似性为 98%–100%); 放线菌门中包括 3 株细菌, 与节杆菌属相似性 99%; α -变形菌纲中仅发现 1 株, 与假苍白杆菌属相似性 99%; β -变形菌纲中包括 7 株细菌, 6 株与产碱杆菌属相似性 99%, 1 株与无色杆菌属相似性 99%; γ -变形菌纲中包括 8 株细菌, 与窄食单胞菌属相似性 99%; 拟杆菌门中只发现 1 株, 与香味菌属相似性 98%。从各类群所占比例来看, 厚壁菌门微生物共分离得到 247 株, 占分离物总数的 92.5%, 其中芽孢杆菌属细菌共分离得到 203 株, 占分离物总数的 76%, 由

此可判断烟草内生细菌的优势种群是厚壁菌门的芽孢杆菌属细菌。

3 讨论

依据 16S rRNA 序列的聚类结果与依据细菌菌落形态的数值分类结果不完全一致, 可能造成这种不一致的原因有: 数值分类法的分类依据是细菌的菌落表型特征, 以表型特征进行聚类反映的是一种表型关系, 并不能反映出细菌的系统发育关系; 此外, 在对大量表型性状进行统计时, 完全取决于观察者的主观判断和研究经验, 直接关系到统计结果的准确性。细菌的菌落形态具有非常丰富的多样性, 以菌落形态进行分类得到的种群数比核酸序列分类得出的类群要多, 说明菌落形态很可能具有一定的种属特征。要想得到可靠的数据聚类结果, 必须进一步细化表型分类指标, 如将菌落表面分为边缘区域和中心区域两部分分别描述, 对菌落边缘的整齐与否进行更详细的描述。

本文首次对烟草可培养内生细菌 16S rRNA 的系统发育开展了研究。发现芽孢杆菌属细菌是烟草可培养内生细菌的优势种群, 该属中的绝大多数芽孢杆菌归属的种群在其他多种植物中也均有发现^[13–15], 芦云^[16]从哈密瓜, 孔庆军等^[17]从棉花, 高增贵等^[18]从玉米中分离的内生细菌也均以芽孢杆菌属为主。这可能与芽孢杆菌属细菌抗逆性强有关, 容易通过偶然途径进入各种植物内部并定殖成为内生细菌。

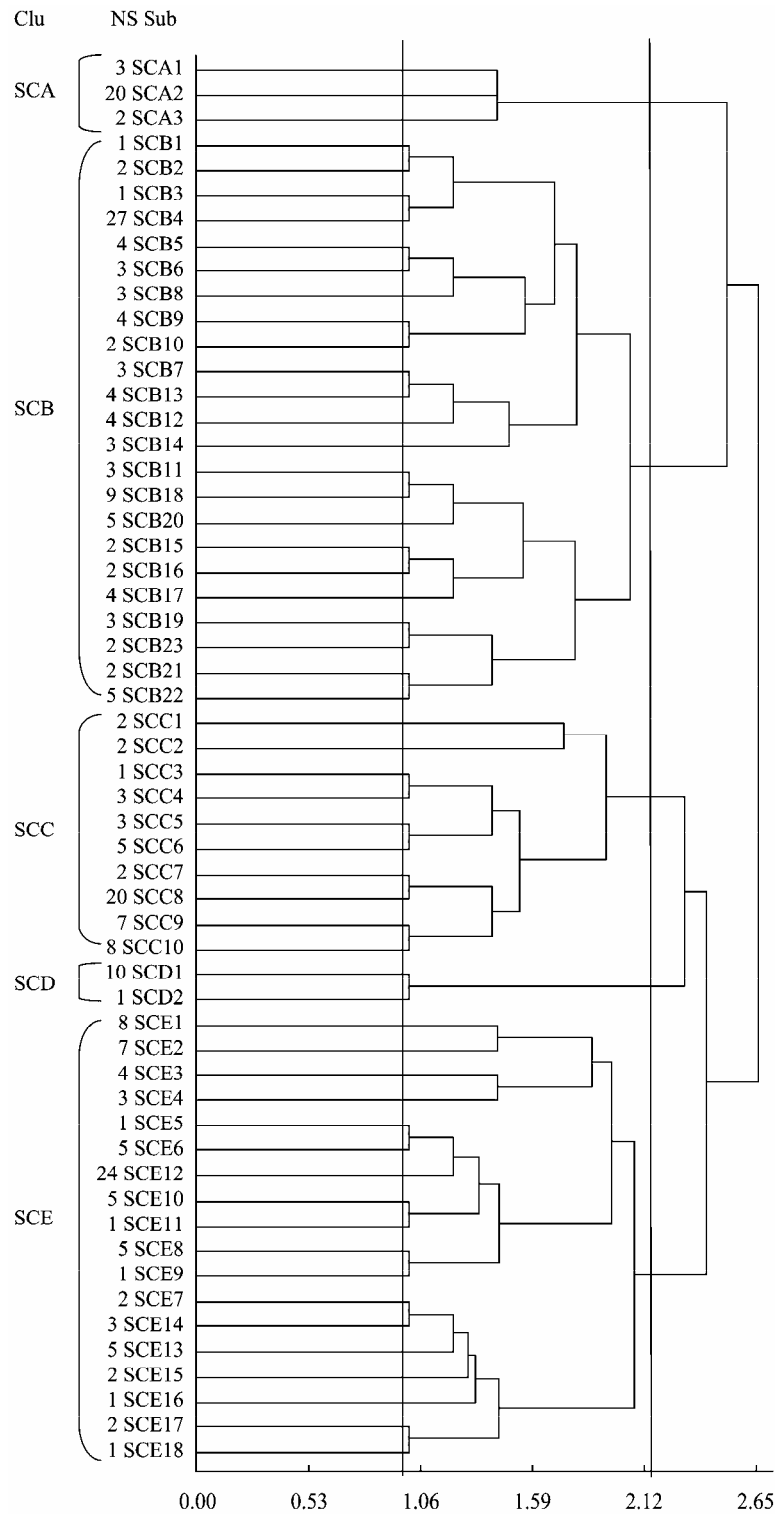


图 2 267 株内生细菌表型特征的数值分类聚类图

Fig. 2 Dendrogram based on the numerical taxonomy of characteristic using clustering analysis

注: NS: 分离物数; Sub: 亚群; Clu: 表观群.

Note: NS: Number of isolates; Sub: Subcluster; Clu: Cluster.

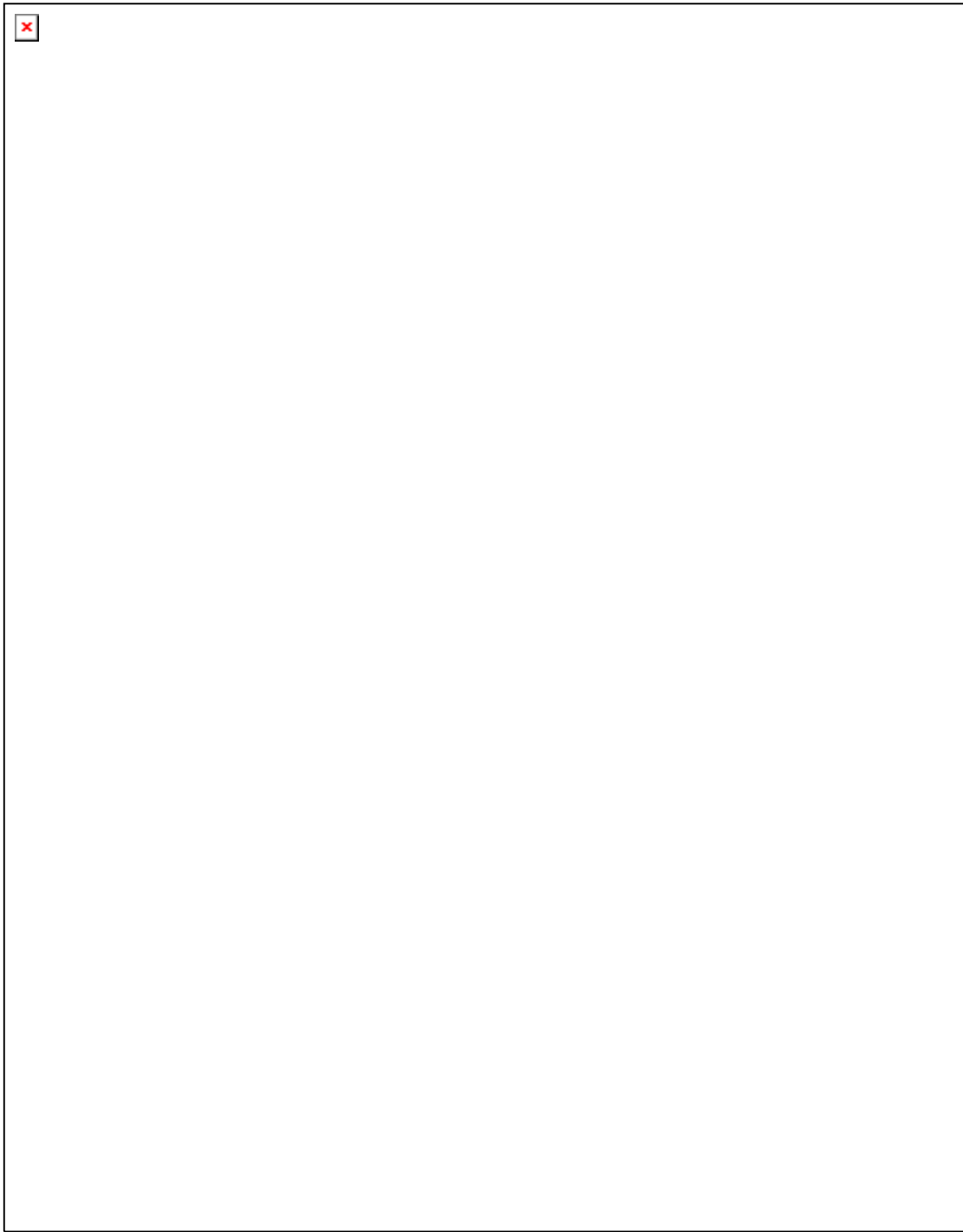


图 3 部分烟草内生细菌 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree for partial strains based on 16S rDNA gene sequences

注: 自展值标注在各分支上, 各分类群名称后的括号中标注该菌株所属的亚群编号, 圆括号内的数字代表分离物的 GenBank 登录号.

Note: The number above each branch is the bootstrap value; (Fir: Firmicutes; Act: Actinobacteria; α -Pro: α -Proteobacteria; β -Pro: β -Proteobacteria; γ -Pro: γ -Proteobacteria; Bac: Bacteroidetes; *Bac*: *Bacillus*; *Lys*: *Lysinibacillus*; *Pae*: *Paenibacillus*; *Cel*: *Cellulosimicrobium*; *Art*: *Arthrobacter*; *Pse*: *Pseudochrobactrum*; *Alc*: *Alcaligenes*; *Ach*: *Achromobacter*; *Ent*: *Enterobacter*; *Ser*: *Serratia*; *Ste*: *Stenotrophomonas*; *Pse*: *Pseudomonas*; *Myr*: *Myroides*). Data in parentheses are the GenBank accession numbers of the isolates represented by the number out of the parentheses. Bar, 0.05 substitution per nucleotide.

假单胞菌、芽孢杆菌、肠杆菌以及土壤杆菌通常被认为是植物内生细菌中可培养细菌的优势种群^[5], 其中土壤杆菌属被认为是植物体内的重要组成部分, 而在研究中并未发现, 另外假单胞菌仅发现 8 株, 肠杆菌仅发现 4 株。造成这种差异的原因可能有取样点不同、取样品种不同、分离及表面灭菌方法不同, 培养基不同等。研究表明, 植物内生细菌分离因取样、消毒方法及培养基选择不同, 其数量和种类有较大差异, 目前尚无统一的定量分析方法^[9]。本研究只分离得到 267 个可培养细菌样本, 不同种类的部分细菌可能未被分离出, 还需通过更广泛的采样才能分离到更多的种类。本研究是依赖于微生物传统培养方法进行的, 许多研究已经证实通过传统的分离方法鉴定的微生物只占环境微生物总数的 0.1%–10%, 不能充分展示微生物的多样性状况^[19–20]。一部分植物内生细菌同其他环境中的微生物一样由于难以模拟其生长繁殖的真实条件而不能获得纯培养。此外, 传统的培养和分离技术都不可避免的偏离这些细菌原来的生境, 而且在新的人为培养条件下会改变微生物群落原来的结构, 这就使得用传统方法研究植物内生细菌的种群结构及多样性受到了极大的限制。因此, 为了更全面地了解烟草内生细菌多样性的真实水平及其物种组成, 有必要利用非培养方法对其组织内未培养微生物进行研究。

参 考 文 献

- [1] Mano H, Tanan T, Watanabe A, et al. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field[J]. *Microb Environ*, 2006, 21(2): 86–100.
- [2] Ryan RP, Germaine K, Franks A, et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 278(1): 1–9.
- [3] Berg G, Krechel A, Ditz M, et al. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 51(2): 215–229.
- [4] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. *植物学报*, 2004, 43(9): 881–892.
- [5] 胡萌. 植物内生细菌研究进展[J]. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2008, 39(1): 148–151.
- [6] 王美琴, 刘慧平, 韩巨才, 等. 番茄内生细菌种群动态分析及拮抗菌株的筛选[J]. *中国农学通报*, 2010, 9: 277–282.
- [7] 邓墨渊, 王伯初, 杨再昌, 等. 分子生物学技术在植物内生菌分类鉴定中的应用[J]. *氨基酸和生物资源*, 2006, 28(3): 9–14.
- [8] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 47.
- [9] 路国兵, 冀宪领, 张瑶, 等. 桑树内生细菌的分离及生防益菌的筛选[J]. *蚕业科学*, 2007, 33(3): 350–354.
- [10] 杨苏声. 细菌分类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 15–18.
- [11] Devereux R, Hines ME, Stahl DA. S cycling: characterization of natural communities of sulfate-reducing bacteria by 16S rRNA sequence comparisons[J]. *Microb Ecol*, 1996, 32(3): 283–292.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬燕, 黎孟枫, 侯云德, 等译. 北京: 科学出版社, 1996: 682.
- [13] 杨瑞先, 葛晓燕. 植物内生细菌生物学作用研究进展及应用前景[J]. *洛阳大学学报*, 2006, 21(4): 78–81.
- [14] 饶小莉, 沈德龙, 李俊, 等. 甘草内生细菌的分离及拮抗菌株鉴定[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 700–704.
- [15] Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Araujo WL, et al. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(22): 7259–7267.
- [16] 罗明, 芦云, 陈金焕, 等. 哈密瓜内生细菌菌群密度及分布动态[J]. *干旱区研究*, 2007, 24(1): 104–109.
- [17] 孔庆军, 任雪艳, 陆江红, 等. 新疆棉花芽孢杆菌的筛选及纯化[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(35): 15470–15471.
- [18] 高增贵, 庄敬华, 陈捷, 等. 玉米根系内生细菌种群及动态分析[J]. *应用生态学报*, 2004, 15(8): 1344–1348.
- [19] Tholozan JL, Cappelier JM, Tissier JP, et al. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(3): 1110–1116.
- [20] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 143–169.