

几株粘细菌显微形态特征比较

赵智颖^{1,2}, 谭志远¹, 朱红惠²

(1 华南农业大学 农学院,广东省植物分子育种重点实验室,广东 广州 510642;2 广东省微生物研究所,广东省菌种保藏与应用重点实验室,广东省微生物应用新技术公共实验室,广东华南微生物应用重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地,广东 广州 510070)

摘要:对几株粘细菌菌株进行显微特征的观察、比较,从而更直观、更准确地了解粘细菌的形态特征,为粘细菌分类鉴定奠定基础.借助体式显微镜(Stereomicroscope, SMC)、扫描电镜(Scanning electron microscope, SEM)和透射电镜(Transmission electricity microscope, TEM)技术,对广东药用植物根际土壤分离得到的黄色粘球菌 *Myxococcus xanthus* 42-lyheh-1、橙色粘球菌 *Myxococcus fulvus* sp-lmz-1、叶柄粘球菌 *Myxococcus stipitatus* 42-4-1、匣状粘球菌 *Pyxidicoccus fallax* 42-10-3、弱小珊瑚杆菌 *Corallococcus exiguous* 42-3-1、珊瑚状珊瑚杆菌 *Corallococcus coralloides* 42-x1-4、大孢珊瑚球菌 *Corallococcus macropsorus* sp-lmz-2、过渡原囊菌 *Archangium gephyra* 42-10-1 和孢囊杆菌 *Cystobacter minus* 42-mts-2 分别进行了子实体结构、菌落形态、营养细胞和粘孢子的观察和精确的测量,进一步完善了粘细菌形态特征的描述,为粘细菌的分类鉴定提供了一定的依据.

关键词:粘细菌; 子实体; 营养细胞; 粘孢子; 显微观察
中图分类号:Q934.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2013)04-0504-07

Comparison of the Microscopic Characteristics of Some *Myxobacteria*

ZHAO Zhiying^{1,2}, TAN Zhiyuan¹, ZHU Honghui²

(1 Guangdong Provincial Key Lab of Plant Molecular Breeding, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510462, China; 2 State Key Laboratory of Applied Microbiology-Ministry Guangdong Province Jointly Breeding Base, Guangzhou Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou Provincial Open Laboratory of Microbial New Application Technique, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Morphological characteristics of several *Myxobacteria* were studied comparatively to get more knowledge of *Myxobacteria* and lay a foundation for their classification and identification. Stereo-microscope(SMC)、scanning electron microscope(SEM) and transmission electricity microscope(TEM) were used to observe the fruiting body, colony, vegetative cell and myxospore of *Myxococcus xanthu* 42-ly-heh-1, *Myxococcus fulvus* sp-lmz-1, *Myxococcus stipitatus* 42-4-1, *Pyxidicoccus fallax* 42-10-3, *Corallococcus exiguous* 42-3-1, *Corallococcus coralloides* 42-x1-4, *Corallococcus macropsorus* sp-lmz-2, *Archangium gephyra* 42-10-1 and *Cystobacter minus* 42-mts-2. This further description of the morphological characteristics will be the foundation of classification of *Myxobacteria*.

Key words: *Myxobacteria*; fruiting body; vegetative cell; myxospore; microscope technic

收稿日期:2012-12-17 网络出版时间:2013-09-09
网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130909.1901.014.html>
作者简介:赵智颖(1987—),女,硕士;通信作者:朱红惠(1970—),女,研究员,博士,E-mail:zhuhonghui66@yahoo.com.cn
基金项目:国家自然科学基金(311000432);新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放基金课题重点项目(BRZD1004)

粘细菌 *Myxobacteria* 属于变形杆菌门的变形菌门 (Proteobacteria) δ 变形菌亚纲 (Deltaproteobacteria)^[1], 共 8 个科, 22 个属, 50 多个种^[2-7], 是一类具有多细胞行为的革兰阴性细菌, 具有运动能力并可产生子实体和抗逆性粘孢子^[8]。

粘细菌属于原核生物, 但却具有复杂的多细胞行为和形态发生机制, 并具有显著的社会学特征^[9], 是目前原核生物中已知的唯一具有多细胞行为特征的类群, 被认为是最高等的原核生物。粘细菌的细胞群体行为不但体现在细胞间通过信号的传递和感应进行协同摄食和运动, 而且集中体现在其子实体结构的分化发育上^[10]。在营养匮乏的条件下, 粘细菌的营养细胞经受协同形态建成^[2], 聚集形成子实体结构。最终, 60% ~ 95% 的细胞发生程序性自溶, 存活的细胞有序排列, 其中一部分形成没有生殖能力的结构细胞^[10], 另一部分细胞在子实体形成末期分化成具抗逆性的粘孢子。粘孢子的形成标志着子实体的成熟和发育过程的结束^[11-12]。

除了分子鉴定, 目前粘细菌的分类鉴定主要依靠粘细菌的形态特征, 主要包括子实体形态、菌落特征、营养细胞和粘孢子形态。粘细菌的形态特征是其分类的一个重要标准, 一是因为粘细菌研究起步比较晚, 粘细菌生理特征的描述只限于个别种属, 大多为粘细菌的模式菌株 *Myxococcus xanthus*^[13]; 另外, 粘细菌形态的复杂性意味着其形态分类比其他细菌更为可靠^[2]。粘细菌依靠其形态特质可初步鉴定到属, 进一步的鉴定需结合分子鉴定手段。

本文通过体式显微镜 (Stereomicroscope, SMC)、扫描电镜 (Scanning electron microscope, SEM) 和透射电镜 (Transmission electricity microscope, TEM) 技术, 对几株粘细菌的子实体结构、菌落形态、营养细胞和粘孢子形态进行了观察和比较。其中, 使用 SEM 和 TEM 比传统的光学显微镜对粘细菌的营养细胞和粘孢子能进行更清晰的观察和精确的测量。本研究旨在更直观、更准确地观察、比较多株粘细菌的形态特征, 为粘细菌的分类鉴定提供了更为清晰的图片材料, 从而为粘细菌分类鉴定提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种资源 粘细菌菌株黄色粘球菌 *Myxococcus xanthus* 42-lyheh-1、橙色粘球菌 *Myxococcus fulvus* sp-lmz-1、叶柄粘球菌 *Myxococcus stipitatus* 42-4-1、弱小珊瑚杆菌 *Corallococcus exiguus* 42-3-1、珊瑚状珊瑚杆菌 *Corallococcus coralloides* 42-x1-4、大孢珊瑚球

菌 *Corallococcus macropsorus* sp-lmz-2、匣状粘球菌 *Pyxidicoccus fallax* 42-10-3、过渡原囊菌 *Archangium gephyra* 42-10-1、孢囊杆菌 *Cystobacter minus* 42-mts-2 是从广东药用植物根系土壤中分离得到, 现保藏于广东省微生物菌种保藏中心。

1.1.2 主要试剂和仪器 氯化钙、戊二醛、无水乙醇、钼酸、叔丁醇等常规分析纯试剂购自环凯公司; 琼脂粉、放线菌酮购于健阳生物公司; 冻干机 (ES-2030); 溅射仪 (E-1010); 体式显微镜 (Leica M165C); 扫描电镜 (日立 S-3000N); 透射电镜 (日立 H-7650)。

1.2 方法

1.2.1 SMC 观察 粘细菌培养 7 d 后, 将培养物放置于体式显微镜的置物台上, 对其菌落形态与子实体进行观察并拍照。

1.2.2 SEM 观察 对培养至有明显子实体产生的粘细菌进行取样, 用解剖刀切取约为 0.5 cm × 0.5 cm × 0.1 cm 的小块, 将其置于 30 g/L 的戊二醛中固定 (≥ 5 h), 然后用 pH 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (PBS) 漂洗 6 次, 每次 20 min; 10 g/L 的钼酸处理 40 ~ 60 min; PBS 漂洗 4 次, 每次 20 min; φ 为 30% 和 50% 乙醇各漂洗 2 次, 每次 10 min; φ 为 75% 和 90% 乙醇各漂洗 1 次, 每次 15 min; 无水乙醇漂洗 3 次, 每次 15 min; 叔丁醇置换 2 次, 每次 20 min; 置于冻干机中冷冻干燥; 将处理后的样品在体式显微镜下观察并贴台; 用溅射仪进行喷金; 置于扫描电镜下观察并拍照^[14]。

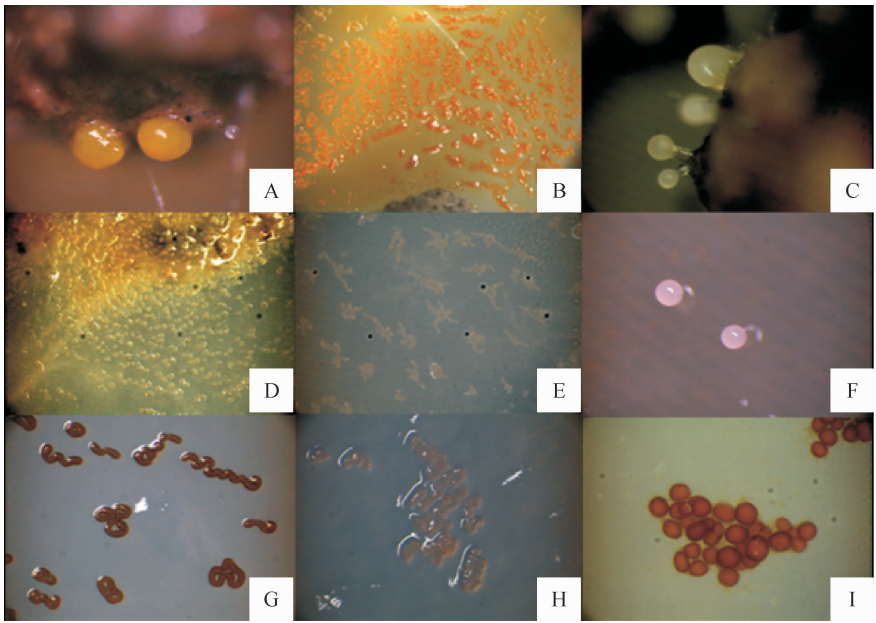
1.2.3 TEM 观察 用接种环刮取培养了 3 ~ 7 d 的适量菌体于无菌水中, 制成样品悬液; 吸取样品悬液滴到有膜的铜网上, 2 min 后用滤纸从铜网边缘吸去多余的液体; 滴加 pH 7.0、30 g/L 的磷钨酸于铜网, 2 min 后用滤纸从铜网边缘吸去多余染液; 滴加纯水于铜网, 用滤纸从铜网边缘吸取多余水, 样品干后电镜观察并拍照^[15-16]。

2 结果与分析

2.1 SMC 观察

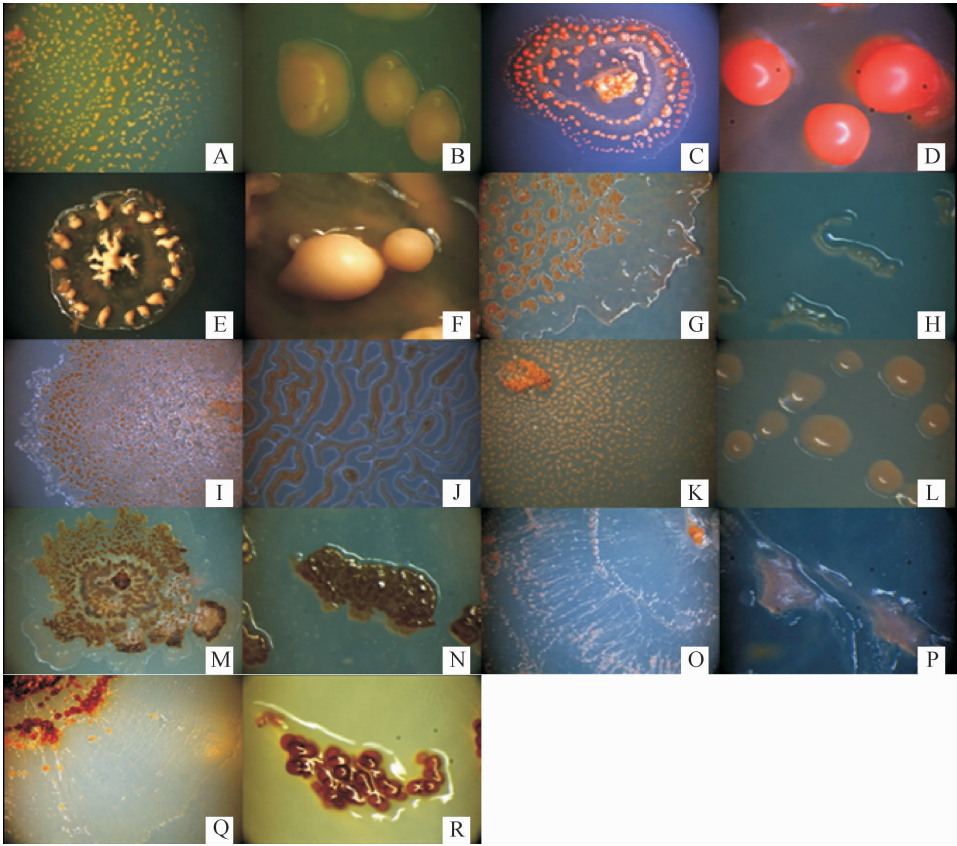
通过 SMC 观察, 可见粘细菌子实体颜色鲜明, 大多呈亮黄色、亮橙色、鹅黄色、粉色、棕色、甚至黑色, 形态多样、结构复杂, 不同种属间子实体形态差异较大, 其特征性子实体结构可作为粘细菌分类的重要依据, 各种属自然环境下形成的子实体形态如图 1 所示。图 2 显示了所观察粘细菌在纯培养状态下形成的菌落和子实体形态, 纯培养后, 部分粘细菌仍能产生特征性子实体, 但相当一部分种属会随着

传代次数的增加,子实体颜色和形态发生改变、甚至出现退化和消失的现象.其中,粘球菌属与孢囊杆菌属的粘细菌基本能保持较好的子实体形成能力.表 1 描述了所观察的各种属粘细菌的主要形态特征.



A: 黄色粘球菌;B: 橙色粘球菌;C: 叶柄粘球菌;D: 弱小状珊瑚杆菌;E: 珊瑚状珊瑚杆菌;F: 大泡珊瑚球菌;G: 匣状粘球菌;H: 过渡原囊菌;I: 孢囊杆菌.

图 1 自然状态下诱导的多株粘细菌子实体形态图
Fig.1 Morphological characteristics of fruiting body of some myxobacteria strains



A,B: 黄色粘球菌;C,D: 橙色粘球菌;E,F: 叶柄粘球菌;G,H: 弱小状珊瑚杆菌;I,J: 珊瑚状珊瑚杆菌;K,L: 大泡珊瑚球菌;M,N: 匣状粘球菌;O,P: 过渡原囊菌;Q,R: 孢囊杆菌.

图 2 多株纯培养粘细菌菌落及其子实体形态图
Fig.2 Morphological characteristics of colony of some myxobacteria strains

表 1 分离到粘细菌各种属的主要形态特征

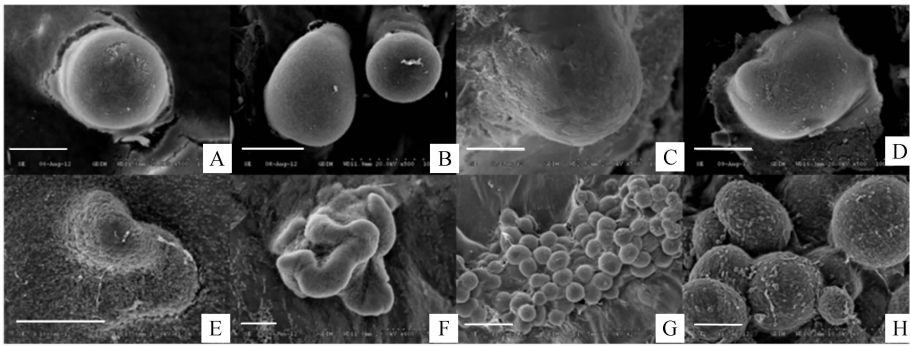
Tab.1 Morphological characteristics of the isolated myxobacteria strains

种属	子实体形态		营养细胞	粘孢子	菌落形态
	自然环境下	纯培养条件下			
黄色粘球菌	黄色,圆球状,无柄,单个或若干个聚集成串,表面光滑,黏液丰富	浅橙色,圆形或近圆形,单个分布,无柄	细长杆状,末端稍微变细,雪茄状,0.5 ~ 0.8 μm × 3.0 ~ 8.0 μm	圆球形,直径为 1.1 ~ 2.0 μm	圆形,菌膜薄而扩展,子实体均匀分布
橙色粘球菌	橙色,圆球状,无柄,单个或若干个聚集成串,表面光滑,黏液丰富	近接种点为橙色,菌落边缘为橘黄色,圆形或近圆形,单个分布,无柄,表面光滑	细长杆状,末端稍微变细,雪茄状,0.6 ~ 0.8 μm × 3.0 ~ 9.0 μm	圆球形,直径为 1.0 ~ 1.7 μm	圆形,菌膜薄而扩展,子实体均匀分布
叶柄粘球菌	乳黄色,头部球形,柄透明	米黄色,球形或不规则状,无柄	细长杆状,末端稍微变细,雪茄状,0.5 ~ 0.8 μm × 4.0 ~ 9.0 μm	圆球形或椭圆形,直径为 1.0 ~ 1.8 μm	不规则,边缘呈波浪状,表面凹凸不平
匣状粘球菌	深褐色或浅褐色,形状不规则,呈圆球状、闭合环状或波浪状,单个分布,表面光滑	棕色、乳白或粉红色,子实体退化,形状不规则,团粒状或长条波浪状聚集成块	细长杆状,末端稍微变细,0.5 ~ 0.6 μm × 5.5 ~ 7.6 μm	圆球形,直径为 1.6 ~ 1.8 μm	形状不规则,边缘薄而扩展,黏液丰富,子实体均匀分布
弱小珊瑚杆菌	球形,小,柔软黏滑,表面光滑,粉红色	球形,柔软黏滑,橙色	细长杆状,末端稍微变细,雪茄状,0.4 ~ 0.7 μm × 3.5 ~ 8.7 μm	圆球形或椭圆形,直径为 1.1 ~ 1.9 μm	柔软黏滑,边缘波浪状
珊瑚状珊瑚杆菌	珊瑚状,浅橙色	山脊状突起,橙色或橙红色	细长杆状,末端稍微变细,雪茄状,0.4 ~ 0.8 μm × 4.2 ~ 8.8 μm	圆球形或椭圆形,直径为 1.0 ~ 2.0 μm	柔软黏滑,边缘波浪状
大孢珊瑚球菌	浅橙色,圆球状,无柄,单个分布,表面光滑	浅橙色,圆形或近圆形,单个分布,无柄,表面光滑	细长杆状,末端稍微变细,雪茄状,0.5 ~ 0.8 μm × 4.0 ~ 9.0 μm	圆球形或椭圆形,直径为 1.2 ~ 2.0 μm	圆形,菌落中心黏液丰富,有黏膜,边缘薄而扩展,子实体均匀分布
过渡原囊菌	橘红色,圆球状或椭圆形,成串分布	近菌落中心为棕褐色,边缘为橘红色,子实体退化,形状不规则,多呈块状	细长型,针状,末端稍微变细,0.5 ~ 0.7 μm × 6.9 ~ 16.7 μm	圆球形,直径为 1.1 ~ 1.5 μm	形状不规则,黏液丰富,有黏膜,螺旋状,边缘薄而扩展,波浪状
孢囊杆菌	球形,单个或多个形成链状或团状,褐色、栗色或者黑色	球形,单个或多个形成链状或团状,被厚的、物色的黏液荚膜包被,褐色、栗色或者黑色	针状,末端稍微变细,0.6 ~ 0.9 μm × 6.5 ~ 14.1 μm	短杆状,末端钝圆或稍稍变细,0.5 ~ 0.7 μm × 1.1 ~ 2.0 μm	菌膜薄而坚硬,有辐射状脉络,边缘不规则或波浪状

2.2 SEM 观察

用 SEM 对多个种属的粘细菌子实体进行了观察,在适宜的条件下,大量的营养细胞发生聚集并停止生长,大部分细胞发生自溶,聚集的细胞发生群体的生态学发育和细胞分化,形成子实体,孢子囊内的营养细胞经形态转变生成粘孢子. 子实

体由一层薄的黏膜包被,孢子囊单独或成群出现,形态多样,呈圆球形、椭圆形、卷曲状、团状或链状(图 3). 在未成熟的子实体中,可观察到不同时期的形状不同的营养细胞和粘孢子;待子实体发育成熟后,组成子实体孢子囊的为均一的粘孢子.



A: 黄色粘球菌 (bar = 100 μm); B: 橙色粘球菌 (bar = 100 μm); C: 叶柄粘球菌 (bar = 100 μm); D: 大孢珊瑚球菌 (bar = 100 μm); E: 匣状粘球菌 (bar = 50 μm); F: 过渡原囊菌 (bar = 50 μm); G, H: 孢囊杆菌 (bar = 200 μm , bar = 50 μm).

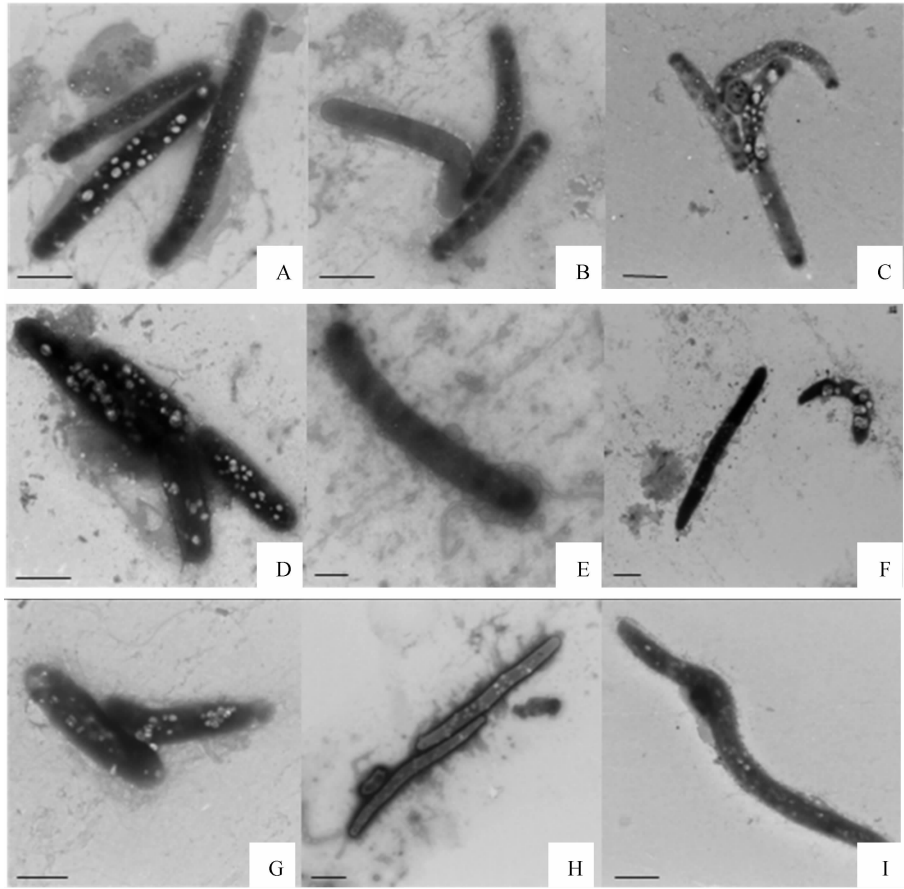
图 3 多株粘细菌子实体的扫描电镜观察

Fig. 3 Scanning electron microscope observation of fruiting body of some *myxobacteria* strains

2.3 TEM 观察

通过 TEM 观察,发现所观察种属粘细菌的营养细胞均属 I 型:呈细长型,末端钝圆或稍稍变细,呈雪茄状或针状,长度变化较大,直径为 0.5 ~ 0.8 μm ,长度为 3.0 ~ 16.7 μm (图 4). 大部分菌体中不均匀的分布着白色泡状物,随着时间的

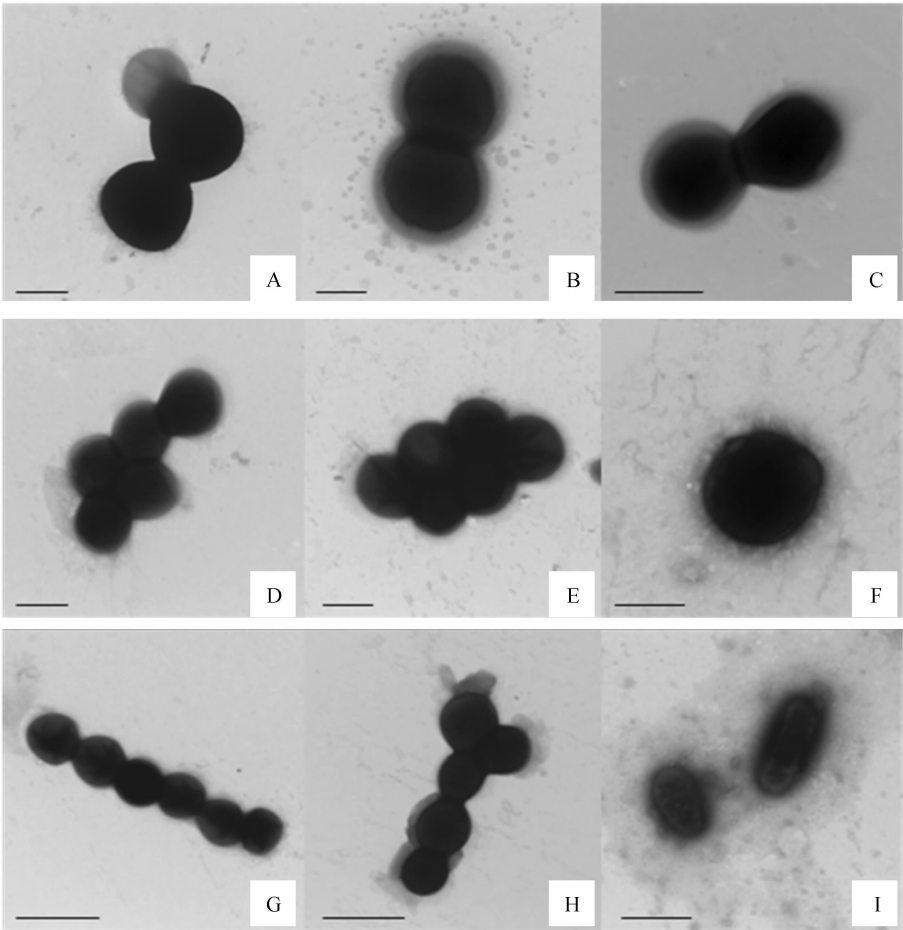
增加,泡状物逐渐变大,菌体呈现溶解状态,此时大部分菌体开始自溶. 粘孢子呈圆球形、椭圆形或短杆状,有强烈的折光性,被一层薄的被膜包裹. 圆球形或椭圆形的粘孢子,直径为 1.0 ~ 2.0 μm ,短杆状粘孢子大小为 0.5 ~ 0.7 μm $\times$ 1.1 ~ 2.0 μm (图 5).



A: 黄色粘球菌 (bar = 2 μm); B: 橙色粘球菌 (bar = 2 μm); C: 叶柄粘球菌 (bar = 2 μm); D: 弱小珊瑚杆菌 (bar = 2 μm); E: 珊瑚状珊瑚杆菌 (bar = 1 μm); F: 大孢珊瑚球菌 (bar = 2 μm); G: 匣状粘球菌 (bar = 2 μm); H: 过渡原囊菌 (bar = 2 μm); I: 孢囊杆菌 (bar = 2 μm).

图 4 多株粘细菌营养细胞的透射电镜观察

Fig. 4 Transmission electricity microscope observation of vegetative cells of some *myxobacteria* strains



A: 黄色粘球菌 (bar = 1 μm); B: 橙色粘球菌 (bar = 500 nm); C: 叶柄粘球菌 (bar = 1 μm); D: 弱小珊瑚杆菌 (bar = 1 μm); E: 珊瑚状珊瑚杆菌 (bar = 1 μm); F: 大孢珊瑚球菌 (bar = 1 μm); G: 匣状粘球菌 (bar = 2 μm); H: 过渡原囊菌 (bar = 2 μm); I: 孢囊杆菌 (bar = 1 μm).

图 5 多株粘细菌粘孢子的透射电镜观察

Fig. 5 Transmission electricity microscope observation of myxospore of some *myxobacteria* strains

3 讨论与结论

以往对粘细菌营养细胞和粘孢子形态的观察多采用普通光学显微镜. 比起普通光学显微镜,TEM 能对粘细菌营养细胞和粘孢子的形态特征进行更精确的观察. 普通显微镜分辨率为 0.1 ~ 0.2 μm ,放大倍数为 1 000 倍,由于分辨率和放大倍数的局限^[17],只能粗略的观察粘细菌营养细胞和粘孢子的形状,对粘细菌营养细胞和粘孢子的长度和大小,也只能做粗略的测量. 而 TEM 分辨率可达 0.1 ~ 0.2 nm,放大倍数可达 60 ~ 100 万倍,能准确区分营养细胞的形状为针形、船形或是雪茄形,末端是钝圆或细长;能准确的测量营养细胞的长度和宽度;能观察到营养细胞的自溶现象;能够清晰辨别粘孢子是圆球形或是椭球形;能观察到粘孢子外部的包膜结构. 粘细菌营养细胞和粘孢子形态结合粘细菌的特征性子实体结构可以将粘细菌鉴定到属,但种与种之间的鉴定仍需要结合分子鉴定手段.

粘细菌子实体的特征性结构是粘细菌分类的最

重要的指标,一般用 SMC 进行观察,但 SMC 放大倍数有限,仅能够用于子实体外部形态和大小的观察,而 SEM 分辨率可达 0.5 ~ 1.0 nm,放大倍数可达 20 ~ 30 万倍,不仅可以对其特征性结构进行准确的描述,还可对子实体结构进行精确的区分:不具有繁殖能力的结构部分,如孢子囊壁、囊柄等;具有繁殖能力的孢子囊部分,其内包含了成熟的粘孢子. 另外,SEM 不仅能观察粘细菌子实体的形态特征,还能观察到子实体形成过程中营养细胞有序聚集、定向爬行运动和营养细胞的形态变化过程.

从土壤样品中分离得到的粘细菌,常常会因培养时间过长或传代次数太多而引起子实体的退化,甚至丧失形成子实体的能力. 因而在分离得到粘细菌后,应及时对其子实体形态进行观察,并选取传代次数较少的粘细菌进行其子实体的扫描电镜观察,以免错失观察粘细菌各种属特征性子实体的最佳时间. 在培养粘细菌时,应选取适当的琼脂质量浓度,质量浓度在 15 g/L 为宜. 培养基太软,在扫描电镜制样时,会增加用手术刀切取样品的难度;培养基太

硬,粘细菌则难以生长,且培养基容易在培养过程中脱水,阻碍粘细菌的正常生长^[18].在透射电镜的制样过程中,若样品悬液中杂质太多,如大量的细胞碎片、培养基残渣、糖类以及各类盐类结晶的存在都会干扰染色反应和电镜的观察^[19];尤其是糖类在电子束的轰击下,容易碳化而有碍于观察;由于粘细菌胞外多糖丰富,因此需减少磷钨酸处理的时间,避免样品在观察时颜色太黑,影响观察结果^[20].

本试验利用从广东药用植物根际土壤分离得到的多个种属粘细菌,通过 SMC、SEM 和 TEM 3 种观察技术,对其子实体结构、菌落形态、营养细胞和粘孢子形态进行了观察和比较,对多个种属粘细菌的显微形态特征进行了详细的描述,为粘细菌分类鉴定提供了图片材料和理论基础.

参考文献:

- [1] DAWID W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils[J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(4): 403-427.
- [2] REICHENBACH H. The Myxococcales [M] // Garrity G M. Bergey's manual of systematic bacteriology: Part 3: The alpha-, beta-, delta-, and epsilon-proteobacteria. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2005: 1059-1143.
- [3] GARCIA R O, REICHENBACH H, RING M W, et al. *Phaselicystis flava* gen nov, sp. nov., an arachidonic acid-containing soil myxobacterium, and the description of *Phaselicystidaceae* fam. nov[J]. In J Syst Evol Microbiol, 2009, 59(6): 1524-1530.
- [4] MOHR K I, GARCIA R O, GERTH K, et al. *Sandaracinus amyolyticus* gen. nov., sp. nov., a starch-degrading soil myxobacterium, and description of *Sandaracinaceae* fam. nov[J]. In J Syst Evol Microbiol, 2012, 62: 1191-1198.
- [5] LIZUKA T, JOJIMA Y, FUDOU R, et al. *Enhygromyxa salina* gen. nov., sp. nov., a slightly halophilic myxobacterium isolated from the coastal areas of Japan[J]. Syst Appl Microbiol, 2003, 26(2): 189-196.
- [6] LIZUKA T, JOJIMA Y, FUDOU R, et al. *Plesiocystis pacifica* gen. nov., sp. nov., a marine myxobacterium that contains dihydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coasts of Japan [J]. In J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(1): 189-195.
- [7] FUDOU R, JOJIMA Y, LIZUKA T, et al. *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: Novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments[J]. J Gen Appl Microbiol, 2002, 48(2): 109-116.
- [8] SHIMKET L J, REICHENBACH H, DWORKIN M. The myxobacteria [M]. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 2006: 31-115.
- [9] KAISER D, DWORKIN M. The myxococcales II [M]. Washington DC: American Society for Microbiology, 1993: 257-283.
- [10] DWORKIN M. Recent advances in the social and development biology of the myxobacteria [J]. Microbiol Rev, 1996, 60(1): 70-102.
- [11] ROSENBERG E. Myxobacteria development and cell interaction [M]. New York: Springer-Verlag, 1984: 65-68.
- [12] 胡玮, 李越中, 张禹清, 等. 细菌的细胞程序性死亡 [J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 255-258.
- [13] SHIMKETS L, SEALE T W. Fruiting-body formation and myxospore differentiation and germination in *Myxococcus xanthus* viewed by scanning electron microscopy [J]. J Bacteriol, 1975, 121(2): 711-720.
- [14] SOO R K, HEE J P, DO S Y, et al. Analysis of survival rates and cellular fatty acid profiles of *Listeria monocytogenes* treated with supercritical carbon dioxide under the influence of cosolvents[J]. J Microbiol Methods, 2008, 75(1): 47-54.
- [15] SÉBASTIEN S, HAYSSAM K, TAO C, et al. Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1463(2): 254-266.
- [16] LUKASZ K, VICTORIA R, MATTHIAS M, et al. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1768(11): 2667-2680.
- [17] MESCHIARI A. A history of photography with the light microscope[J]. NUNCIUS, 2012, 27(1): 222-223.
- [18] CRAWFORD B J, BURKE R D. TEM and SEM methods [J]. Method Cell Biol, 2004, 74: 411-441.
- [19] ZSCHECH E. Trends in TEM sample preparation [J]. Prakt Metallogr-Pr M, 2004, 42(4): 163-165.
- [20] ZSCHECH E. Challenges to TEM sample preparation [J]. Prakt Metallogr-Pr M, 2005, 42(4): 159-160.

【责任编辑 霍 欢】