

一株产庆大霉素 B 的绛红小单孢菌的分类鉴定

王飞, 高辉, 涂国全*

(江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘要:通过对一株自行筛选的野生稀有放线菌菌株的分类地位进行了研究, 鉴定其分类地位。采用常规方法进行分离培养, 以形态学特征、培养特性、生理生化特征及分子生物学等方法对其进行分类鉴定。将所分离的菌株进行摇瓶发酵, 将发酵液上清液采用 HPLC 进行组分检测。该菌株菌落微黄色或浅棕色; 产红色色素, 气生菌丝不发达, 基内菌丝直径平均 $0.4 \sim 0.8 \mu\text{m}$, 产单孢子, 生理生化特征与绛红小单孢菌相似, 16 S rDNA 测定结果与 *Micromonospora* sp. (EU214948) 序列同源性达 97%, 与 *M. purpurea* (X92595) 最为接近。其发酵产物中含有庆大霉素 B、小诺霉素和庆大霉素。鉴定该菌株为产庆大霉素 B 的小单孢菌属绛红小单孢菌 (*Micromonospora purpurea*)。

关键词:放线菌; 分类鉴定; 绛红小单孢菌

中图分类号: Q939.9 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)04-0806-06

Classification and Identification of a *Micromonospora purpurea* Strain Which Produces Gentamicin B

WANG Fei, GAO Hui, TU Guo-quan*

(College of Bioscience and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: In this paper, to study the classification of a screened wild rare actinomycete strain. It was separated by routine isolation methods and identified with morphological features, cultural, physiological and biochemical characteristics and molecular biological methods etc. It was fermented in shaking flask. Afterwards, the proportion of components in supernatant liquor of the fermentation fluid and maceration extract of mycelia were tested by HPLC respectively. Its colony was light yellow or brownish. It produced red pigment. Aerial mycelium was undeveloped. Substrate mycelium diameter was $0.4 - 0.8 \mu\text{m}$ by average. It produced single spore and its physiological and biochemical features were similar to those of *Micromonospora purpurea* strain. 16S rDNA sequencing was similar to *Micromonospora* sp. (EU214948) with the similarity of 97%. And it was mostly similar to *M. purpurea* (X92595). Supernatant liquor of fermentation broth from strain *Micromonospora purpurea* 227 contained Gentamicin B, Micronomicin and Gentamicin. This Actinomycetes strain was *Micromonospora purpurea* which could produce Gentamicin B, Micronomicin and Gentamicin.

Key words: actinomycetes; classification and identification; *Micromonospora purpurea*

收稿日期: 2011-01-05 修回日期: 2011-06-08

基金项目: 江西省自然科学基金项目 (0530010)

作者简介: 王飞 (1976-) 男, 讲师, 硕士, 主要从事微生物学研究, E-mail: wangfei179@163.com; * 通讯作者: 涂国全, 教授, E-mail: tuguquan@263.net。

小单孢菌属是放线菌中产生抗生素的一个重要的家族,由其所产生的生物活性物质包括庆大霉素、西索米星、小诺霉素、阿司米星、罗沙米星、红霉素 B、利福霉素 S 等^[1-2]。庆大霉素 B 是小单孢菌(*Micromonospora sagamiensis*)及其变异株所产生的一种氨基糖苷类抗生素,由它可合成广谱低毒性的氨基糖苷类抗生素异帕米星[1-N-(S-氨基-2-羟基-丙酰基)庆大霉素 B]^[3-5]。江西农业大学应用微生物实验室从土壤中筛选到一株放线菌 227 菌株,对 G⁺ 细菌有较好的抗性,抗菌谱与庆大霉素、小诺霉素一致。本文运用鉴定分类法和 16S rRNA 序列分析法对该菌株进行了形态、培养特征、生理生化特征和 16S rRNA 序列分析等研究,确定了该菌的分类地位,并通过 HPLC 对其摇瓶发酵产物进行了检测,确定其产物中含有庆大霉素 B 组分。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 放线菌 227 菌株,本实验室自行分离菌株。绛红小单孢菌(*Micromonospora purpurea*)。购自中国菌种保藏中心。

1.1.2 培养基 克氏一号琼脂、蔗糖察氏琼脂、葡萄糖酵母膏琼脂、马铃薯浸汁琼脂、柴斯纳琼脂(Tresner)、明胶液化培养基、牛奶凝固胨化、淀粉水解琼脂、纤维素水解培养基、硝酸盐还原培养基、高氏一号琼脂、葡萄糖天门冬素琼脂、碳源利用基础培养基^[6-9]。

摇瓶发酵培养基(g/L):葡萄糖 50 g;酵母膏 5 g;(NH₄)₂SO₄ 10 g;MgSO₄·7H₂O 0.5 g;ZnSO₄ 0.04 g;FeSO₄·7H₂O 0.03 g;水 1 000 mL,115 °C 灭菌 30 min。

1.1.3 试剂 麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、阿拉伯糖、木糖、肌醇、甘露醇、果糖、明胶、可溶性淀粉、(NH₄)₂SO₄、KNO₃、NaCl、KH₂PO₄、FeSO₄、MnCl₂、CaCO₃、柠檬酸铁(以上均为 A. R. 级)。

PCR 引物^[10-11]: 27f: 5′ - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3′; 1492r′ - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3′,由上海生工合成。

1.1.4 仪器和器皿 生化恒温培养箱;离心机;高压蒸汽灭菌锅;摇床;干燥箱;移液枪;超净工作台;冰箱;电子天平;MP 试剂盒(FastDNA[®] SPIN for Soil Kit);MILLIPORE 纯水系统;Eppendorf PCR 仪;UVP 凝胶成像系统。三角瓶;培养皿;试管;试剂瓶;容量瓶;量筒;牛津杯等。

1.2 方法

1.2.1 形态和培养特征 将待鉴定菌株作插片培养,观察是否形成气生菌丝及孢子丝;孢子丝的形态;孢子的形状和孢子壁的结构。观察基质菌丝是否断裂,气生菌丝体颜色、孢子丝和孢子的颜色、基质菌丝体的颜色、有无产生孢子或孢囊等。

1.2.2 生理生化特性 按照文献[1]的方法,对放线菌 227 菌株分别进行明胶液化、淀粉水解、牛奶的凝固与胨化、纤维素水解实验、硝酸盐还原、硫化氢产生实验和碳源利用等生理生化特征鉴定。

1.2.3 16S rRNA 序列分析 (1) 菌株 DNA 的提取和 16S rDNA PCR 扩增。将菌株进行纯化后,保存。将斜面菌种捣碎,涂布至高氏一号平板,挑取少许单菌落,按 MP 的 FastDNA[®] SPIN for Soil Kit 试剂盒说明书操作。16S rDNA PCR 扩增反应体系和程序^[12-13]。

(2) 直接测序和序列分析。将 16S rDNA PCR 扩增好的 PCR 扩增产物,送上海生工公司进行双向测序。

(3) 相似性分析。将上海生工测出序列到 Genbank 数据库进行相似性搜索。选用 Bioedit、MEGA4 软件,应用邻接法(Neighbor - Joining)构建系统发育树^[14-15]。

1.2.4 摇瓶发酵 取生长丰满的斜面进行摇瓶发酵,35 °C、220 r/min 培养 7 d。将发酵液 4 000 r/min 离心 30 min,收取上清液,再以等体积丙酮浸提菌丝体,1 d 后收取浸提液。

1.2.5 组分检测 采用柱前衍生反相色谱法,条件如下:柱:ODSC18 柱;检测波长:330 nm;温度:20 °C;进样量:20 μL;衍生化试剂:OPA 溶液;流动相:稀溶液(庚烷磺酸钠 4 g、甲醇 680 mg、水 280 mg、冰醋酸 40 mL);浓溶液(庚烷磺酸钠 4 g、甲醇 780 mg、水 180 mg、冰醋酸 40 mL);样品过滤后进样,流动相采用梯度法,先用稀溶液,15 min 后换浓溶液至所有组分全部洗出为止。



图1 放线菌 227 菌株菌落形态
Fig. 1 Form of Actinomycetes 227



图2 放线菌 227 菌株菌落背面形态
Fig. 2 The opposite side form of Actinomycetes 227

2 结果与分析

2.1 形态和培养特征结果

将放线菌 227 菌株接种至高氏一号平板培养,在 7 d 和 30 d 时观察菌落形态(图 1、图 2)。

从图 1 和图 2 看出,该菌株菌落微黄色或浅棕色;产红色色素,色素不渗透。气生菌丝不发达,经培养 30 d 后产生少量粉红色或污白色气生菌丝。

将放线菌 227 菌株接种至高氏一号平板作插片培养,7 d 后取下插片,在 1 600 倍光学显微镜下观察菌丝形态(图 3)。

由图 3 可看出放线菌 227 菌株基内菌丝体发达,有分枝。菌丝纤细,经显微测微尺测量,平均直径 0.4 ~ 0.8 μm 。在菌丝体上分枝生出一个小梗,梗上着生 1 个单孢子,孢子单个顶生,圆形至卵圆形,直径 0.8 ~ 1.4 μm ,少数达 2 μm 。

将菌种接种在高氏一号培养基、克氏一号培养基、察氏培养基、葡萄糖天门冬素培养基、葡萄糖酵母培养基、PDA 培养基上。于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养,分别于 7, 14, 28 d 观察菌株在各种培养基上的培养特征、生长情况及颜色变化(表 1)。

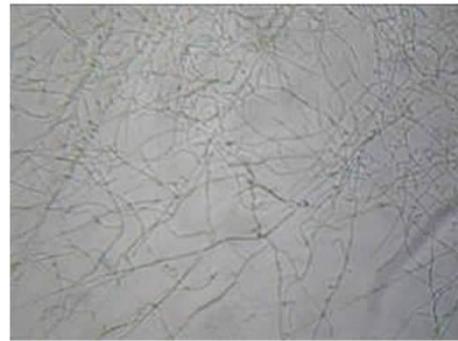


图3 放线菌 227 菌株菌丝形态
Fig. 3 The trace form of Actinomycetes 227

表 1 放线菌 227 菌株的培养特征

Tab. 1 Cultivate characteristics of Actinomycetes 227

培养基 Medium	高氏 1 号琼脂 Gause's synthetic agar	克氏 1 号琼脂 Kilgler Iron agar	察氏琼脂 Czapek's agar	葡萄糖天门冬素 琼脂 Glucose asparagine	葡萄糖酵母膏琼脂 Yeast extract peptone dextrose	马铃薯葡萄糖 琼脂 Potato dextrose agar
气生菌丝 Aerial mycelia	红棕色	灰白色	褐黑色	棕色	深褐色	淡棕色
基内菌丝 Substrate mycelium	褐黑色	蜜黄色	蜜黄色	浅褐色	铁棕色	桂皮色
可溶性色素 Soluble pigments	无	无	无	无	无	无

2.2 生理生化特征

对放线菌 227 菌株作生理生化鉴定 结果见表 2。

表 2 放线菌 227 菌株的生理生化的性状及与绛红小单孢菌的比较

Tab.2 Character of Actinomycetes 227 and compare to *Micromonospora purpurea*

糖类利用 Carbohydrate utilization	菌株 Strain	放线菌 227 Actinomycetes	绛红小单孢菌 ^[2] <i>Micromonospora purpurea</i>
	D - 葡萄糖	++	+
	L - 阿拉伯糖	+	+
	D - 木糖	+	+
	蔗糖	++	+
	D - 核糖	++	+
	D - 甘露糖	+	+
	D - 纤维二糖	+	+
	a - 海藻糖	+	+
	可溶淀粉	++	+
	L - 鼠李糖	-	-
	棉子糖	-	-
	肌醇	-	-
	D - 甘露醇	±	-
	D - 阿拉伯糖	-	-
	甘油	±	-
	L - 山梨糖	-	-
	D - 山梨醇	-	-
	乳糖	-	-
	麦芽糖	+	±
明胶液化		+	+
牛奶凝固		+	+
牛奶胨化		+	+
淀粉分解		+	+
纤维素利用		±	+
硝酸盐还原		±	+
产硫化氢		-	-
产类黑色素		-	-

“-”、“+”、“++”“±”代表不生长、生长、生长良好及不确定。

“-”、“+”、“++”“±”express no growth growth grow well and uncertain whether the growth.

根据培养特征、形态特征以及生理生化特征 查阅《放线菌分类鉴定》。放线菌 227 菌株的生理生化特征归属于小单孢菌属 在形态特征、培养特征上与绛红小单孢菌(*Micromonospora purpurea*) 相似 现代分类学的主要依据是分子生物学如 16S rRNA 基因序列分析而非生理生化和形态特征 为验证其是否为绛红小单孢菌 进一步做了 16S rRNA 序列分析。

2.3 16S rRNA 基因序列分析结果

2.3.1 放线菌 227 菌株总 DNA 提取和 16S rDNA 片段的 PCR 扩增 放线菌 227 菌株总 DNA 经质量分数为 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分析 结果在大于 23 kb 处出现条带(图 4)。从电泳图谱中可以看出该菌的总 DNA 提取质量较好 没有严重的拖尾现象 可以用于后续的 16S rDNA 的 PCR 扩增。

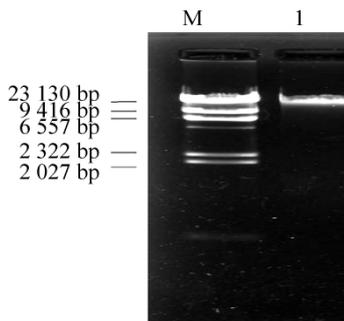


图 4 放线菌 227 菌株的总 DNA 电泳图谱
Fig. 4 The map of DNA about Actinomycetes 227

放线菌 227 菌株总 DNA 的 16S rDNA 片段的 PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测,发现获得了特异性扩增片段(图 5)。

由电泳图谱可以看出,放线菌 227 菌株的 16S rDNA 的 PCR 扩增结果比较理想,可以用于后续的 16S rDNA 测序。

2.3.2 16S rDNA 测序结果 将 16S rDNA 的 PCR 扩增产物送上海生工测序,经测定 227 菌株的 16S rDNA 基因片段大小为 1 354 bp,序列结果如下:

2.3.3 构建系统发育树 放线菌 227 菌株的 16S rDNA 序列在 NCBI 网上 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 BLAST,使用 Bioedit 和 MEGA4 软件,应用邻接法(Neighbor - Joining) 构建系统发育树(图 6) 确定了放线菌 227 菌株的系统发育地位。

CGAGCCGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTTCCCCAGGCTTTGGGATAACC
CCGGGAAACCGGGCTAATACCGAATATGACCTTGCACCGCATGGTGTGGTGGAAAG
TTTTTCGGCTTGGGATGGGCTCGCGCCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACC
AAGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGC
CTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGC
AGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGTAAAGCGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGATTATTGGGCGTAAAGAGC
TCGTAGGCAGCTTGTTCGGCTGACTGTGAAAACCCGCAGCTCAACTGCGGGCCTGCA
GTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
AAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATAC
TGACCGCTGAGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCAC
GCTGTAAACGTTGGCGCTAGGTGTGGGGGCCTCTCCGTTCCCTGTGCCGCAGCTA
ACGCATTAAGCGCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAA
CCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGCAAAAAGTGTGAGAGATGGCAGGTCCTTCGGGGGC
GGTCACAGGTGGTGCATGGCTGCTCAGCTCCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTCGATGTTGCCAGCGGTTATGGCGGGGACTCATCGA
AGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCCT
ATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGTTACAATGGGCTGCGATACCGTGAG
GTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCC
CGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGTACACACCGCCCTCAGTTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTG
GCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCCCTCGAAGG

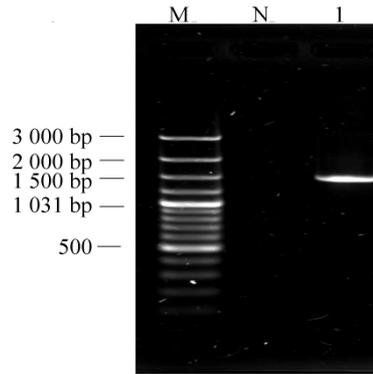
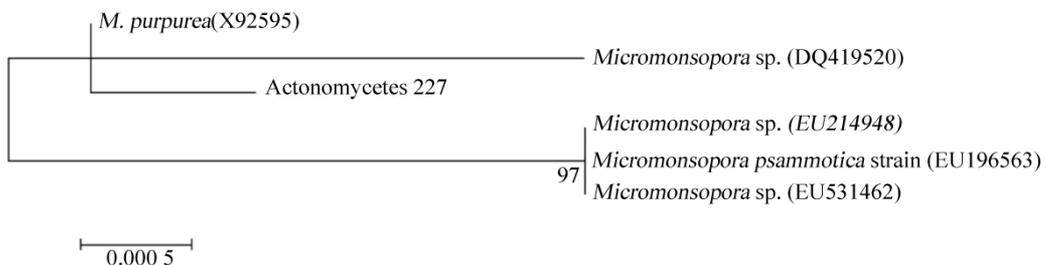


图 5 放线菌 227 菌株的 16S rDNA 电泳图谱

Fig.5 The map of 16S rDNA about Actinomycetes 227



Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar. 3% sequence divergence.

图 6 放线菌 227 菌株的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of Actinomycetes 227

结果显示放线菌 227 菌株为小单孢菌属 (*Micromonospora*) 放线菌, 与 *Micromonospora* sp. (EU214948) 序列同源性达 97% 其中与 *M. purpurea* (X92595) 最为接近, 初步鉴定放线菌 227 菌株为绛红小单孢菌。命名为绛红小单孢菌 227 菌株 (*Micromonospora purpurea* 227)。

2.4 发酵产物分析

2.4.1 标品检测 取含量 85% 的庆大霉素 B 标品进行 HPLC 检测 结果见图 7。

2.4.2 样品检测 将绛红小单孢菌 227 菌株发酵液上清液处理完毕后, 过滤进样, 进行 HPLC 检测 其结果见图 8。

由图 8 可知 绛红小单孢菌 227 菌株上清液中庆大霉素 B 含量为 41.45% 小诺霉素含量为 27.94%, 庆大霉素含量为 25.54% 其组分比 $m(\text{庆大霉素 B}) : m(\text{小诺霉素}) : m(\text{庆大霉素}) = 4 : 3 : 2.5$ 。

3 小 结

(1) 通过形态和培养特征、生理生化鉴定等经典分类法对放线菌 227 菌株进行分类学的研究 经与参考文献比对 初步确定放线菌 227 菌株为小单孢菌科小单孢菌属。

(2) 通过 16S rRNA 序列分析, 放线菌 227 菌株与 *Micromonospora* sp. (EU214948) 序列同源性达 97% 其中与 *M. purpurea* (X92595) 最为接近, 初步鉴定放线菌 227 菌株为绛红小单孢菌 (*Micromonospora purpurea*)。

(3) 在形态特征上放线菌 227 菌株培养时间延长后产生少许气生菌丝, 色素不扩散; 在某些生理生化指标上如纤维素的利用等方面放线菌 227 菌株与绛红小单孢菌有微小差异。

(4) 通过对绛红小单孢菌 227 菌株的 HPLC 检测 确定了所产抗生素含量及组分比, 其中庆大霉素 B 可用来合成异帕米星, 有较高的商业前景和经济价值, 有待于进一步的开发。

参考文献:

- [1] Gactom, Vicente - soler J, Cansado J, et al. Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells [J]. Journal of Applied Microbiology 2000 88: 961-967.
- [2] Kafetzis D A. Isepamicin versus amikacin for the treatment of acute pyelonephritis in children [J]. Int J Antimicrob Agents, 2000, 14: 51.
- [3] 李文均, 张忠泽, 姜成林. 几种主要稀有放线菌的选择性分离 [J]. 国外医药抗生素分册, 2002, 23(1): 18-22.
- [4] Weinstein M J, Luedemann G M, Oden E M, et al. Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora* [J]. J Med Chem, 1963 6: 463-466.
- [5] 方红, 张婴元. 氨基糖苷类抗菌新药: 异帕米星 [J]. 新药与临床, 1996, 15(5): 299-301.

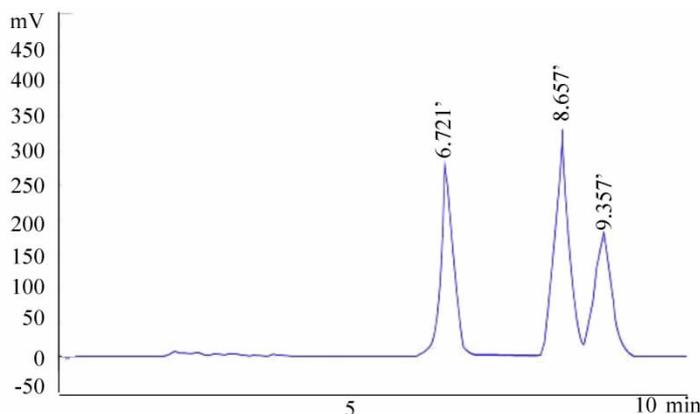


图 7 庆大霉素 B 标品 HPLC 检测结果
Fig. 7 Detections of gentamicin B by HPLC

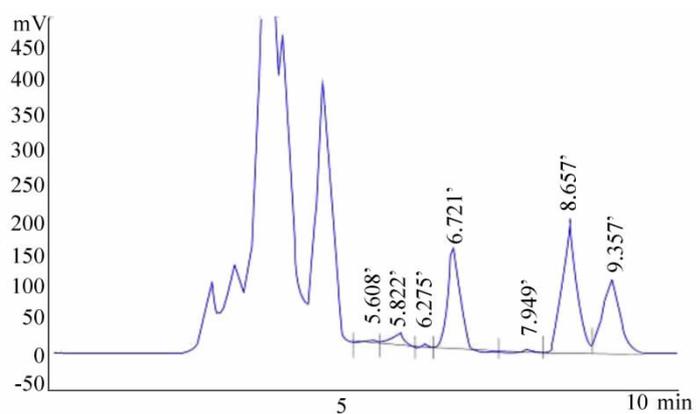


图 8 绛红小单孢菌 227 菌株上清液 HPLC 检测结果
Fig. 8 HPLC determination results of fermentation of *Micromonospora purpurea* 227

(下转第 834 页)

- [8]李勇,陆继东,林兆祥,等.应用激光诱导击穿光谱检测土壤中的铅[J].应用光学,2008,29(5):789-792.
- [9]于乐,赵华风,马晓红,等.激光诱导击穿光谱土壤重金属污染检测方法研究[J].激光杂志,2008,29(5):64-65.
- [10]Kaiser J, Galiová M, Novotny K. Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Spectrochimica Acta Part B, 2009, 64: 67-73.
- [11]Galiová M, Kaiser J, Novotny N, et al. Investigation of heavy-metal accumulation in selected plant samples using laser-induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Appl Phys A, 2008, 93: 917-922.
- [12]Noll R, Bette H, Brysch A, et al. Laser-induced breakdown spectrometry applications for production control and quality assurance in the steel industry[J]. Spectrochim Acta B, 2001, 56(6): 637-649.
- [13]Salle B, Lacour J L, Mauchien P, et al. Comparative study of different methodologies for quantitative rock analysis by Laser-induced breakdown spectroscopy in a simulated Martian atmosphere[J]. Spectrochim Acta B, 2006, 61(3): 301-313.
- [14]张大成,马新文,朱小龙,等.用激光诱导击穿光谱技术比较百合和土豆中的微量元素[J].光谱学与光谱分析,2009,29(5):1189-1192.
- [15]张大成,马新文.激光诱导击穿光谱应用于三种水果样品微量元素的分析[J].物理学报,2008,57(10):6348-6353.
- [16]Lilian Cristina Trevizan, Dário Santos Jr, Ricardo Elgul Samad, et al. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of macronutrients in plant materials[J]. Spectrochimica Acta Part B, 2008, 63: 1151-1158.
- [17]Lilian Cristina Trevizan, Dário Santos Jr, Ricardo Elgul Samad, et al. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of micronutrients in plant materials[J]. Spectrochimica Acta Part B, 2009, 64: 369-377.

(上接第811页)

- [6]阎逊初,施兰卿,范淑琴.放线菌的分类与鉴定[M].1版.北京:科学出版社,1992.
- [7]George M Garrity, Matthew Winters, Denise B Searles. Taxonomic outline of the prokaryotic genera Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. 2nd ed. New York: Springer-verlag, 2001: 22.
- [8]Gordon R E, Barnett D A, Handerman J E, et al. Nocardia coeliaca, nocardia autotrophica, and the nocardia strain[J]. Int J Syst Bacteriol, 1974, 24: 54-63.
- [9]Fox G E, Pechmom K R, Woese C R. Comparative cataloging of 16S ribosomal RNA sequencing in bacterial systematics[J]. Methods Microbiol, 1987, 19: 406-445.
- [10]姜怡,李文均,崔晓龙,等.链霉菌属一新种的多相分类[J].云南大学学报,2004,26(2):179.
- [11]刘丽华.26株具有细胞毒活性的海洋放线菌的分类鉴定研究[D].海南:华南热带农业大学,2006.
- [12]闫莉萍,洪葵,胡申才,等.海南近海30株抗B16细胞活性放线菌的16S rDNA多样性分析[J].微生物学报,2005,45(2):185-190.
- [13]Cinzia Corinaldesi, Roberto Danovaro, Antonio Dell'Anno. Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 46-50.
- [14]Stackebrandt E, Liesack W. Nucleic acids and classification//Goodfellow M, O'Donnel A. Handbook of new bacterial systematics[M]. London: Academic Press Ltd, 1993.
- [15]张灵霞,庄辉.16S-23S rDNA间隔区序列PCR和RFLP分析对分枝杆菌复合菌群鉴定的研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2000,20(4):312-315.