

链霉菌分类研究进展*

李 炜 刘志恒

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

THE ADVANCE ON TAXONOMY OF *STREPTOMYCES**

Li Wei Liu Zhiheng

(*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China*)

关键词 链霉菌 分类 进展

中图分类号 Q939.13 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2001)01-0121-06

自从 Waksman 和 Henrici^[1]于 1943 年建立链霉菌属(*Streptomyces*)以来,链霉菌已成为细菌域中种的数量最大的一个属。目前,包括出现在专利中的种已经超过 3000 个,至 1996 年已有有效描述的种 464 个和亚种 45 个^[2]。由于链霉菌是产生抗生素等生物活性物质种类最多的一类微生物,因此至今各国学者仍在不断研究设计新的分离、培养、鉴定和分类方法,以指导新的天然生物活性物质的寻找。但长期以来,国际上因缺少可以接受的统一的分类鉴定标准,导致了链霉菌分类中的混乱。自 60 年代以来,国际分类学家为解决链霉菌分类中的实际问题进行了大量的合作研究^[3~5],但均未对链霉菌种或种的同名者作出定义。1983 年 Williams 等人^[6]利用数值分类对链霉菌及相关菌进行了大量的研究,为澄清链霉菌混乱的分类系统作出了贡献。

70 年代化学分类(Chemotaxonomy)和 80 年代分子分类(Molecular taxonomy)的发展,为分类学研究注入了新的活力。通过研究发现一些表观群中的菌株在分子分类中出现在不同的基因群中^[7~9],这说明通过表观型建立的分类系统存在一定的局限性,已不能完全客观地反映链霉菌的自然分类关系。现在链霉菌分类学研究正发展成为把传统的表型分类(形态和生理生化特征)、数值分类、化学分类和分子分类等各种信息综合考虑,来确定菌株的分类地位的多相分类(Polyphasic taxonomy)。多相分类被认为是目前研究各级分类单位的最有效手段,能更客观地反映生物间的系统进化关系。

1 链霉菌属的建立和早期的表观分类

最初,土壤微生物学家出于生物学描述的需要,使用色素、孢子链形态来描述“链霉菌”,并通过少数非标准的实验用二分法来鉴定未知菌株。这一时期使用的是放线菌属这一名称^[10,11]。直到 1943 年 Waksman 和 Henrici 提出建立链霉菌属这一分类单位以与放线菌属这一临床上微好氧的微生物相区分^[1]。

由于长期缺乏统一的分类和鉴定标准,研究者仅仅根据形态和培养特征上的一些微小差异来描述自己的新种,从而导致了大量链霉菌种的出现。从 1940 到 1957 年仅有 100 多个链霉菌种被描述^[12],而到 1970 年这个数字剧增至 3000 种以上^[13],大量的菌种和混乱的分类标准使得链霉菌的分类处于极大

* 国家自然科学基金资助项目(39670001)

作者简介 李 炜(1972-)男,云南昆明人,中国科学院微生物研究所博士,主要从事链霉菌分类研究。

收稿日期:1999-09-23 修回日期:1999-12-08

的混乱中。这一问题导致了两个分别由美国和国际微生物学会主持的合作研究的开展^[3,4],研究的目的是评价链霉菌分类中使用的方法。结果显示在分类研究中随意选择特征指标、非标准的测定条件、颜色测定的人为误差、及无法获得相关菌株都严重制约了链霉菌的系统分类研究。

1964 年,由国际微生物学会细菌命名委员会放线菌分委会(AMS)策划了国际链霉菌计划(ISP)^[5],目的是为链霉菌属及链轮丝菌属(*Streptovorticillium*)研究提供可靠描述的模式菌株。这个项目中,至少三名不同国家的专家在严格的标准条件下对相同菌株进行了形态特征、色素、和碳源利用测定。最终有 450 个链霉菌及相关属的菌株得到详尽的描述。ISP 计划尽管没有建立客观的分类系统及尝试对链霉菌种或种的同名词进行定义,但为日后链霉菌研究提供了可靠描述的模式菌株,并获得了大量的数据,成为构成第八版《伯杰细菌鉴定手册》链霉菌部分的基础^[14,15]。

这一时期还有大量的研究者尝试使用一些简单的分类方法把数量巨大的链霉菌归入较少的一些群(group)或系列(series)中(见表 1)^[6],这些分类在一定程度上能很好地进行类群划分,但由于只使用了少数特征并过分强调形态和色素的作用,故不能客观地反映菌株的自然分类地位。

表 1 早期的链霉菌分类

时间	研究者	使用特征	群数
1957	Gause 等	气丝和基丝颜色	15
1958	Prdham 等	孢子柄形态及气丝颜色	42
1958	Shinobu 等	孢子柄形态及黑色素和亚硝酸盐产生	13
1961	Waksman 等	气丝和基丝颜色,孢子链形态,黑色素产生,蛋白分解等	16
1965	Prdham 等	孢子表面纹饰	8
1976	Prdham 等	孢子表面纹饰	10
1967	Hutter	孢子柄形态,气丝和基丝颜色,黑色素产生	41
1975	阎逊初等	孢子表面纹饰,气丝和基丝颜色,色素,孢子丝形态	14

2 数值分类

数值分类(Numerical Classification)是通过计算分析大量的特征(>50),计算出相似值来考察菌株间的相互关系,它是建立在计算机应用上的一种分类方法。在数值分类中,单一的特征是没有分类意义的,因而它能更客观地描述菌株的分类关系。且一旦分类关系确定后,就可以从中挑选出特征性的指标用于菌株的鉴定。

链霉菌数值分类的应用最早是在 1962 年,Gilardi 等^[16]报道了以大量特征进行数值分类研究,并把结果编算成概率鉴定特征表。此后有大量的数值分类报道,但这些研究所用的特征都相对有限。直到八十年代,随着计算机的普及和性能的提高,数值分类才得到了广泛运用。1983 年 Williams 等人对链霉菌及相关属的 475 个菌株(包括 ISP 中的 394 个模式菌株)的 139 项特征进行了测定,并用数值分类法对数据进行处理,结果在 77.5%的 S_{SM} 水平上把菌株归入了 9 个群组(cluster-group),23 个大群(major cluster),20 个小群(minor cluster)和 25 个单株群(single cluster)。这些群中,小群和单株群被认为相当于种,而大群则可看作种组,需要进行更多的研究。研究结果还显示,过去建立的孢器放线菌属(*Actinopycnidium*)、钦氏菌属(*Chainia*)、孢囊放线菌属(*Actinosporangium*)、鞘孢囊菌属(*Elytrosporangium*)、北里菌属(*Kitasatoa*)和小英孢囊菌属(*Microellobosporia*)应归入链霉菌属,后来的数值分类和分子分类研究也支持这一结论。另一方面,间孢囊菌属(*Intrasporangium*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioda*)、链轮丝菌属(*Streptovorticillium*)在他们的研究中构成独立的分支。

Williams 等人对链霉菌分类的另一贡献是运用数值分类的结果建立了用于链霉菌鉴定的概率矩阵,通过 Wilcox 概率、分类距离和分类距离的标准差三个由 MATIDEN 程序产生的系数来鉴定链霉菌^[17]。

在这之后, Goodfellow 等人^[18]重新检验了 Williams 等人的大部分菌株及大部分的特征并增加了基于 7-氨基-4-甲基香豆素(7-MAC)和 4-甲基-7-羟基香豆素(4-MU)的快速酶测定,发现与 Williams 等人的结果有极好的一致性,并发现快速酶测定在链霉菌种的定义有较高价值。

Kämpfer 等人^[19]用数值分类方法测定了链霉菌属和链轮丝菌属 821 个菌株的 329 个特征,发现尽管有很大差异,但 Williams 的大部分大簇可以被辨认出来。他们发现链轮丝菌属应该被归入链霉菌属,这与 Witt 和 Stackebrandt^[20]通过 DNA-DNA 杂交和 16S rDNA 部分序列的系统发育分析结果一致。Kämpfer 等人也建立了基于数值分类的鉴定概率矩阵^[21]。

通过数值分类研究,链霉菌混乱的分类系统得到了清理,并趋于客观。但特征选择、实验误差、统计方法的差异及菌株的不稳定均会影响数值分类的结果。同时,用概率矩阵方法鉴定链霉菌所需的最少实验数仍然很大,且不能在同一矩阵中鉴定大、小和单株群,是一项费时费力的工作,其结果有时也非常难以解释。

3 化学分类研究

1976 年 Lechevalier^[22]根据放线菌胞壁化学组分和全细胞水解液糖型分析,将放线菌分为 9 个主要胞壁类型和 4 个糖型,并提出了以化学与形态特征相结合划分放线菌属的观点,这一观点已被广泛接受并成为放线菌定属的标准。随着分析技术和设备的发展,至今已建立了一套完整的化学分类方法,如胞壁化学组分分析、磷酸类脂、醌、枝菌酸、脂肪酸分析等^[23]。80 年代末蛋白质图谱分析和特定蛋白的氨基酸序列分析也开始应用于链霉菌分类研究^[24~26]。

一些化学方法如细胞壁化学组分分析、磷酸类脂、醌、枝菌酸分析等不能单独用于分类研究,需和其它方法结合才具分类价值,目前这些方法已成为放线菌定属的必需指标。同时,随着大量新技术,如色谱、质谱技术在分类中的运用,使得分类研究更为快速、灵敏和准确。

来自脂肪酸和蛋白质的数据能提供更多的分类信息,可用于属以下分类单位的研究。G.S. Saddler 等人^[27]对深蓝链霉菌(*S. cyaneus*)表观群的脂肪酸气相色谱研究发现,该表观群被分成了两个群。Manchester 等人^[28]通过全细胞蛋白 SDS-PAGE 图谱分析, Ochf^[26]对 81 株链霉菌的核糖核蛋白 AT-L30 的 2D-PAGE 电泳图谱及 N-末端氨基酸序列分析表明,他们在相当程度上与表型分类的结果相一致。由于链霉菌种的数量巨大,而化学方法,特别是 SDS-PAGE 分析由于可以快速、准确地分析大量菌株,并有极高的可重复性,因而是一种极有希望的研究方法。同时,一些属于相同表观群的菌株在研究中出现在不同的化学分类群中,这说明现有的数值分类有待发展。

4 系统进化研究

Stackebrandt 和 Woese^[29]在 80 年代根据 16S rRNA 相似性、DNA-rRNA 和 DNA-DNA 杂交的结果构建了放线菌和其它生物之间的系统发育树。这标志着放线菌分子分类时期的开始。随着分子生物学的发展,分子分类正成为分类学的主要方法,越来越受到重视。目前经常用到的分子特征包括 DNA 的 G+C mol%、Ribotyping、随机扩增 DNA 多型性分析(RAPDA)、低频限制性酶切片片段分析(LFRA)、扩增 rDNA 限制性酶切片片段分析(ARDRA)、扩增片段长度多型性分析(AFLP)、16S-23S rRNA 间隔区序列分析、16S/23S rRNA 序列分析、DNA-DNA 杂交、DNA-RNA 杂交等^[30]。

目前,研究菌株分类地位最有效的方法就是把它放到系统发育树中,考察与其它菌株之间的关系,再结合其它分类信息来最终确证其分类地位。随着核酸测序技术的发展,16S rRNA 序列越来越多地被用于放线菌的系统进化研究并已成为确立放线菌新分类单位的必要数据,如假诺卡氏菌科就是主要建立在 16S rRNA 序列分析基础上的^[31]。近年报道的链霉菌新种大多是通过 16S rRNA 序列分析确定的。随着互联网的迅速发展,我们可以很快捷、容易地从一些大型数据库如核糖体数据库计划(Ribosomal Database Project, RDP)或 EMBL/GenBank 获得相关菌株的 16S rRNA 序列用于构建系统发育树。目前

常用的方法是,首先对研究菌株的 16S rRNA 测序,得到的序列送到 EMBL/GenBank 和 RDP 比较。RDP 收录的是接近完整的有效发表种的 16S-rRNA 序列(大于 1300bp)。GenBank 的序列则包括部分序列(可能只有一百多碱基)]再根据返回的相似性数据从 GenBank 或 RDP 调相似性较高的序列构建系统发育树。

目前链霉菌研究中报道了四种构建系统发育的方法^[32,33]:(1)邻接法(neighbor-joining)(2)最小平方方法(least-squares)(3)极大似然法(maximum-likelihood)(4)最简约法(maximum-parsimony);其中 neighbor-joining(N-J)是目前普遍使用的方法。树的可信度是通过进行 1000(或 500)次自举分析(bootstrap)得到的 bootstrap 值来考察的,在最近的文献中有的作者还通过在 N-J 树上标示与其它三种方法相同的分枝来显示可靠性^[32]。总的来说,构建方法对树的影响不大,而外群(out group/root)的选择对结果有直接的影响,最好选取与研究对象关系较远的菌株作外群。Kim D 等人^[33]在研究中发现,在以球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)大肠杆菌(*E. coli*)枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)星状诺卡氏菌(*Nocardia asteroides*)为外群时北里孢菌属(*Katasatospora*)与链霉菌属分别构成独立的分枝,而以玫瑰链孢囊菌(*Streptosporangium roseum*)为外群时,它们混在了一起。

由于 16S rRNA 的保守性很高,有时不能提供足够的分辨率以区分关系较近的链霉菌及相关属,而可变性较高的 16S-23S 转录间隔区则可有效地区分菌株间的差异;同时,用 16S-23S 转录间隔区序列构建的系统发育树同样很好地把北里孢与链霉菌区分开了^[34]。

16S rRNA 只反映了细菌 DNA 的一小部分,它们反映的菌株间的关系可能会有偏差。总 DNA 杂交使用的是菌株的总 DNA,能最大程度地反映菌株间的自然关系,是目前确定菌株间关系最可靠的方法。但杂交不能用于关系较远的菌株间,且需两两配对实验,不可能用于大量的菌株间。因此,需要所有菌株的各种数据综合起来进行多相分类研究。

5 多相分类研究

多相分类的概念是由 Colwell^[35]于 1970 年提出的,目前已被广泛应用,它是综合考虑微生物的表型、基因型和系统发育等多种信息进行分类的方法。概括地讲,多相分类是传统的表型分类、数值分类和分子分类等方法的综合应用,因而可以更客观地反映生物间的系统进化关系。它被认为是研究各级分类单位最有效的方法。当我们用两种以上方法进行分类研究时,我们已经在使用多相分类的概念了。但须指出的是,多相分类目前还处于幼年时期,还没有严格的规则。因此研究时应包括尽可能多的方法,并尽量做到分类特征的可重复性以减少人为因素的影响。

目前化学、分子分类由于可靠性较高,逐渐成为分类研究的主要方法,而数值分类由于实验误差、统计方法和菌株的不稳定等的影响,可靠性会降低,需用其它方法来检验^[36]。从研究的结果看,数值分类和分子分类的结果还是有一定相关性的。甘薯链霉菌类群(*S. ipomoea*)的 DNA 同源性数据与数值分类有很高的一致性^[7]。甘薯类群的 RFLP 图谱也能与 DNA-DNA 杂交数据很好地吻合^[37]。16S rRNA 分析^[2]同样支持 Williams 等人^[38]提出的 *S. canescens*, *S. coelicolor*, *S. felleus*, *S. limosus*, *S. odorifer* 和 *S. sampsonii* 是 *S. albidoflavus* 同义语的建议。同样,很多证据也显示一些表观群是异源(heterogeneous)的^[7-9]。

目前链霉菌的分类研究处于一个相对平静的时期,大量的工作是用于对现有的分类单位及方法进行评价及寻找新的分类单位上,以期对链霉菌分类的新突破积累材料。Gilson 等人^[36]对土壤链霉菌分离株进行多相分类研究得出了有趣的结果,数值分类、表型分类和分子分类的结果是一致的。

1992 年 Wellington 等人^[39]发现北里孢菌属与链霉菌有很多相同的表型特征,及较高的 16S rRNA 序列同源性,在用概率鉴定表鉴定时,被归入 *Streptomyces exfoliantus* 群中,故建议把北里孢菌属划入链霉菌。Ochi 等人^[26]对核糖核蛋白 AT-L30 的 N 末端序列分析也支持这一结果。但这样意味着必须对链霉菌属的定义加以修改以容纳胞壁两型的菌株。而最新的多相分类研究表明^[34,40]北里孢菌属在形态

发育、16S rRNA、16S-23S 间隔区分析及 DNA-DNA 杂交上都与链霉菌构成两个独立的分支,因此北里孢菌属应该恢复。Wellington 等人的研究由于当时技术的限制,用于研究的菌株数量较少,结果受到了影响。研究同时证明了化学分类用于放线菌属的划分的可靠性。

在种、属的水平上,rRNA 相似性在多大程度才比较妥当至今尚无公认的标准。目前一些分类学家将 DNA 相似性定在 70% 以上,G+C mol% 相差小于 5% 为同一种。而 16S rDNA 序列和 DNA-DNA 杂交比较的结果显示:70% 的 DNA-DNA 匹配性对应于约 97% 的 16S rDNA 相似性^[41]。16S rDNA 只占细菌总 DNA 的一小部分,在用于区分关系较近的种和/或菌株差异时,其作用是非常有限的,有时两菌的 16S rRNA 同源性超过 99%,但总 DNA 杂交的却显示很低的同源性^[42,43]。16S rRNA 的运用类似 DNA 的 G+Cmol%,主要作用是验证。当两菌的 16S rRNA 相差 3% 以上时,可以认为它们不是同种,若小于 3%,则不能肯定,需结合其它方法如总 DNA 杂交来确证。Liu 等人^[44]的研究显示 *S. microstreptospora* 与 *S. setonii*(99.18%),*S. griseus* subsp. *griseus*(99.11%) 和 *S. ornatus*(98.97%) 有极高的 16S rRNA 同源性,但 DNA-DNA 杂交率只有 52%,12% 和 6%,说明它们不是同种。

需要指出的是,由于有效种的数量庞大,大量的种还没有接近完整的 16S rRNA 序列数据,使得通过 16S rRNA 构建链霉菌属的系统发育树不完整,目前普遍采用的用 16S rRNA 分类方法遇到了困难:对于能与已知菌株聚在一起的未知菌株,可以很容易地结合其它方法确定其分类地位,而对那些构成单独分支的未知菌株却反而不易确定其地位及相关的参照菌株。故应在研究中多用几种方法,以提高结果的客观性。最近 Ueda 等人在 GenBank 注册了包括大量模式种在内的 500 多株链霉菌的 16S rRNA 的部分序列(120bp),在目前大量链霉菌模式种没有 16S rRNA 序列的情况下,在研究中,特别是发表链霉菌新分类单位时,这些长度只有 120 碱基的序列可提供非常有用的信息。

6 我国链霉菌分类研究现状

我国从 50 年代起,由于抗生素工业发展的需要,开始了从土壤中分类链霉菌的研究工作。多年来分离了大量的链霉菌并积累了丰富的知识。据统计,我国学者用中文描述发表的链霉菌种已多达 187 个。1975 年我国出版的《链霉菌鉴定手册》^[45]反映了我们以往的研究成果。然而令人遗憾的是,除了少数种近年在国际上取得有效发表外,由于我们与国际链霉菌研究水平存在的差距,过去我国发表的链霉菌“新种”均未取得国际承认的有效发表。这不仅严重影响了我国这方面知识产权的形成,也极大地增加了进一步开发和持续利用这类微生物资源的难度。因此应用多相分类方法评价现有分类系统,研究我国生物活性链霉菌的分类单位,建立快速、准确的链霉菌鉴定方法是目前我国链霉菌研究的重要课题。

参 考 文 献

[1] Waksman S A , Henrici A T. *J Bacteriol* ,1943 **A6** 337~341.
[2] Hain T , Ward-Rainey N , Kroppenstedt R M , et al. *Int J Syst Bacteriol* ,1997 **A7** 202~206.
[3] Gottlieb D. *Appl Microbiol* ,1961 **9** 55~65.
[4] Küster E. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* ,1959 **9** 97~104.
[5] Shirling E B ,Gottlieb D. *Int J System Bacteriol* ,1966 **A6** 313~340.
[6] Williams S T , Goodfellow M , Wellington E M H , et al. *J Gen Microbiol* ,1983 **A29** :1743~1813.
[7] Labeda D P. *Gene* ,1992 **A115** 249~253.
[8] Labeda D P. *Int J Syst Bacteriol* ,1992 **A43** 822~825.
[9] Labeda D P. *Int J Syst Bacteriol* ,1998 **A48** 829~832.
[10] Jones H L. *Soil Sci* ,1930 **A30** 59~77.
[11] Waksman S A. *Soil Sci* ,1919 **A8** 71~215.
[12] Pridham T G , Hesseltine C W , Benedict R C 中国微生物学杂志 1998,6(5):279-299编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [13] Trejo W H. An evaluation of some concepts and criteria used in the speciation of streptomycetes. Trans N. Y. Acad Sci , Ser II 1970 **32** :989~997.
- [14] Pridhan T G , Tresner H D. Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici. In :Buchanan R E , gibbons N E. Bergey's manual of determinative bacteriology , 8th ed. Williams & Wilkins Co. ,Baltimor ,1974. 748~829.
- [15] Pridhan T G , Tresner H D. Family VII. *Streptomycetaceae* Waksman and Henrici 1943 ,339. . In :Buchanan R E , gibbons N E. Bergey 's manual of determinative bacteriology , 8th ed. Williams & Wilkins Co. ,Baltimor ,1974. 747~748.
- [16] Gilardi E , Hill L R , Turri M , *et al.* *Giorn Microbiol* ,1960 **8** :203~218.
- [17] Williams S T , Goodfellow M , Wellinton E M H , *et al.* *J Gen Microbiol* ,1983 **129** :1815~1830.
- [18] Goodfellow M , Ferguson E V , Sanglier J J. *Gene* ,1992 **115** :225~233.
- [19] Kämpfer P , Kroppenstedt R M , Dott W. *J Gen Microbiol* ,1991 **137** :1831~1891.
- [20] Witt D , Stackebrandt E. *System Appl Microbiol* ,1990 **13** :361~371.
- [21] Kämpfer P , Kroppenstedt R M , Dott W. *J Gen Microbiol* ,1991 **137** :1893~1902.
- [22] Lechevalier M P , Lechevalier H A. *Int J Syst Bacteriol* ,1970 **20** :435~443.
- [23] 阮继生 ,刘志恒 ,梁丽糯 ,等.放线菌研究及应用.北京 :科学出版社 ,1990.80~183.
- [24] Ochi K. *J Gen Microbiol* ,1989 **135** :2635~2642.
- [25] Fierro J F , Parra F , Quiros L M , *et al.* *FEMS Microbiol Lett* ,1987 **41** :283~287.
- [26] Ochi K. *Int J Syst Bacteriol* ,1995 **45** (3) :507~514.
- [27] Saddler G S , O 'Donnell A G , Goodfellow M , *et al.* *J Gen Microbiol* ,1987 **133** :1137~1147.
- [28] Manchester L , Pot B , Kersters K , *et al.* *System Appl Microbiol* ,1990 **13** :333~337.
- [29] Stackebrandt E , Woese C R. *Current Microbiology* ,1981 **5** :197~202.
- [30] Vandamme P , Pot B , Gillis M , *et al.* *Microbiol Rev* ,1996 **60** (2) :407~438.
- [31] Embley T M , Smida J , Stackebrandt E. *Syst Appl Microbiol* ,1988 **11** :16~19.
- [32] Kim B , Sahin N , David E M , *et al.* *Int J Syst Bacteriol* ,1999 **49** (1) :7~17.
- [33] Kim D , Chun J , Shina N , *et al.* *Int J Syst Bacteriol* ,1996 **46** (2) :581~587.
- [34] Zhang Z S , Wang Y , Ruan J S. *Int J Syst Bacteriol* ,1997 **47** (4) :1048~1054.
- [35] Colwell R R. *J Bacteriol* . 1970 **104** :410~433.
- [36] Gilson P M , Jolanta Z-C , Ekrem A , *et al.* Towards Minimal Standards for the Description of *Streptomyces* Species. Proceeding of the 9th international symposium on the biology of actinomycetes , Moscow , 1994.
- [37] Beyazova M , Lechevalier M P. *Int J Syst Bacteriol* ,1993 **43** :674~682.
- [38] Williams S T , Goodfellow M , Alderson G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943 ,339^{AL}. In :Williams S T , *et al.* Bergey 's Manual of systematic bacteriology. vol 4. Williams and Wilkins. Baltimor ,Md. 1974. 2452~2492.
- [39] Wellington E M H , Stackebrandt E , Sanders D , *et al.* *Int J Syst Bacteriol* ,1992 **42** :156~160.
- [40] Takahashi Y , Seino A , Iwai Y , *et al.* *Zent bl Bakteriolo* ,1999 **289** :265~284.
- [41] Stackbrandt E , Goebel B M. *Int J Syst Bacteriol* ,1994 **44** :846~849.
- [42] Fox G E , Wisotzkey J D , Jurtshuk P. *Int J Syst Bacteriol* ,1994 **42** :166~170.
- [43] Yassin A F , Rainey F A , J Burghardt , *et al.* *Int J Syst Bacteriol* **47** :983~988.
- [44] Liu Z H , Shi Y , Zhang Y , *et al.* *Int J Syst Bacteriol* , in press.
- [45] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组.链霉菌鉴定手册.北京 :科学出版社 ,1975.