

樟树内生细菌 EBS05 的鉴定及其抗菌活性物质性质的研究

文才艺* 尹志刚 陈建光 李洪连

(河南农业大植物保护学院 河南 郑州 450002)

摘要: 在形态学分类的基础上, 通过 16S~23S rRNA ISR(Intergenic spacer regions)序列分析, 对樟树内生细菌EBS05 进行了分类鉴定, 结果表明EBS05 为枯草芽孢杆菌。测定了EBS05 代谢活性物质的理化性质, 结果表明, 活性组分在 λ 213.5 nm处有最大光吸收峰; 在pH 5~8 范围内其抗菌活性稳定, 当pH < 4.0 或pH > 9.0 时, 抗菌活性显著降低; 热稳定性良好, 60°C~80°C处理 2 h后, 抗菌活性不变, 1×10^5 Pa灭菌 30 min后, 抗菌活性仍然保持在 65%以上; 具有较强的抗紫外线照射能力, 对蛋白酶K不敏感; 具有较好的醇溶性, 易溶于甲醇和乙醇, 不溶于乙酸乙酯、乙腈和石油醚等有机溶剂。

关键词: 植物内生细菌, 枯草芽孢杆菌, 16S~23S rRNA 间隔区, 抗菌活性

Identification of Endophytic Bacteria EBS05 from *Cinamonum camphra* and Property of Its Antimicrobial Compound

WEN Cai-Yi* YIN Zhi-Gang CHEN Jian-Guang LI Hong-Lian

(College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: An endophytic bacterium strain EBS05 from *Cinamonum camphra* was identified as *Bacillus subtilis* by morphological taxonomy and sequence analysis of 16S~23S rRNA intergenic spacer regions. Properties of antimicrobial compound produced by EBS05 were assayed. The active compound had the maximum absorbance peak at λ 213.5 nm. The antimicrobial activity was stable in solution with pH value from 5 to 8, and decreased significantly in solution with pH value less than 4.0 or more than 9.0. The antimicrobial compound had thermodynamics stability. Its activity changed a little after treated at 60°C~80°C for two hours, and compared with 65% original activity after treated at 1×10^5 Pa for 30 minutes. The active substance had high resistance to ultraviolet radiation and protease K. Antimicrobial compound was soluble in alcohol solution, which was easily dissolved in methanol and ethanol, but not dissolved in ethyl acetate, acetonitrile and petroleum *et al.*

Keywords: Plant endophytic bacteria, *Bacillus subtilis*, 16S~23S rRNA ISR, Antimicrobial activity

植物内生细菌是产生抗生素、促植物生长剂、水解酶、蛋白酶、抗肿瘤等生物活性物质的潜在生物资源,且更容易从中获得新的活性物质^[1,2]。近年来,植物内生细菌作为植物病害生防因子和新型生物活性化合物的开发途径已成为植物微生物学和植物病理学应用基础研究的热点。目前已从近 30 种植物中分离到 60 多属的内生细菌,不仅从中分离鉴定出一些细菌新种,而且从中获得了多种新型抗生素,如双乙酰藤黄酚、吩嗪羧酸、藤黄绿脓素、吡咯菌素、脂多肽类抗生素等^[3],显示出良好的研究和应用前景。内生细菌 EBS05 是我们从樟树表皮组织内分离到的一株对多种病原真菌和烟草花叶病毒(TMV)具有稳定抑制活性的生防菌株^[4,5]。通过对小麦纹枯病防治的盆栽和大田试验证实,该内生细菌所产生的抗菌活性物质在病害防治过程中起着重要作用。本文根据 EBS05 的形态和生理生化特征以及 16S~23S rRNA ISR 序列分析对其进行了分类鉴定,并对其产生的抗菌活性物质的理化性质进行了研究,为正确选择抗菌活性物质的分离纯化工艺和该内生细菌的进一步研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试菌株: 内生细菌 EBS05 和烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)均由河南农业大学植物病理学教研室分离、保存。

1.1.2 培养基: NA 培养基用于 EBS05 菌种的保存和种子培养, NYD 液体培养基用于菌种的发酵, PDA 培养基用于培养病原真菌和测定抑菌活性。以上培养基的配制方法参照文献^[6]。

1.2 实验方法

1.2.1 EBS05 的理化性质测定及形态学分类: 参照文献^[7,8]。

1.2.2 EBS05 的 16S~23S rRNA ISR 序列分析: 参照文献^[9,10]。16S~23S rRNA ISR 序列扩增引物为 A-f: 5'-GAAGTCGTAACAAAGG-3'; B-r: 5'-CAAGGCATCCACCGT-3', 由北京三博远志生物技术公司合成。PCR 扩增反应在 Biometra T-1 型热循环仪上进行, 25 μ L 反应体系中包括细菌 DNA 1.0 μ L, Taq 酶 0.2 μ L, dNTP(2.5 mmol/L) 4.0 μ L, 10 \times PCR 缓冲液(含 25 mmol/L MgCl₂) 2.5 μ L, 引物(10 pmol/L) 各 0.5 μ L。反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 10 s; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物用

TaKaRa PCR Fragment Recovery Kit(Code No. D301) 切胶回收。回收 DNA 片段使用 TaKaRa DNA Ligation Kit(Code No. D6022) 中的 Solution I 与 pMD18-T Vector 载体连接, 热转化至 *E. coli* Competent Cells JM109 中, 涂布平板, 过夜培养菌体, 挑选阳性菌落, 提取质粒, 送北京三博远志生物技术公司测序。序列用 DNAMAN 软件分析处理, 并与 GenBank 中相关的序列进行比对, 应用 Neighbour-joining 方法绘制系统进化树。

1.2.3 活性物质粗提物的制备及其抗菌活性检测: 从斜面培养基上挑取 1 环 EBS05 菌体, 接种到 NA 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、170 r/min 振荡培养 1 d 后作为种子液。取种子液按照体积比 5% 的接种量接入新鲜 NYD 培养液中, 30 $^{\circ}$ C、170 r/min 振荡培养 3 d。发酵液在 4 $^{\circ}$ C、10000 r/min 条件下离心 15 min, 弃沉淀, 上清液经 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤后, 用 6.0 mol/L HCl 调节其 pH 值至 2.0, 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜, 10000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 沉淀用 pH 2.0 无菌双蒸水清洗 3 次后, 再用甲醇提取 3 次, 抽提液经旋转蒸发仪蒸干即得灰白色粉末状粗提物。抗菌活性测定采用管碟法^[11], 牛津杯内加入 0.1 mg/mL 粗提物溶液 100 μ L, 指示菌于 28 $^{\circ}$ C 培养 4 d 后, 用十字交叉法准确测量抑菌圈直径, 以抑菌圈直径的大小表示抑菌活性强弱。抑菌圈直径(mm) = 测量值 - 6(牛津杯直径)。

1.2.4 抗菌活性物质理化性质的测定: 1) 紫外吸收特性: 粗提物用 70% 甲醇配制成 0.1 mg/mL 的溶液, 以 70% 甲醇为对照(调零), 于紫外分光光度计(Amersham biosciences Ultrospec2100pro, USA)上分别对发酵液和粗提液在 200 nm~400 nm 范围内进行紫外扫描, 扫描条件: Scan width 200 nm~400 nm, Scan speed 400 nm/min。

2) 酸碱稳定性: 分别用 6.0 mol/L HCl 和 NaOH 调节粗提液的酸碱度, 使其最终 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、9.0、10.0、11.0、12.0, 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜, 6000 r/min 离心 15 min, 取上清液并将溶液的 pH 值依次调至 8.0, 分别测定各处理的抑菌活性, 以未处理粗提液(pH 8.0)为对照, 重复 3 次。

3) 热稳定性: 将粗提液分别在 60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、90 $^{\circ}$ C 水浴锅中处理 2 h 以及在 1 $\times 10^5$ Pa 条件下分别处理 10 min、20 min、30 min, 自然冷却后, 用管碟法分别测定其抑菌活性, 以未处理粗提液为对照, 每组处理重复 3 次。

4) 对紫外线和蛋白酶K的稳定性: 取少量粗提液, 在 25 W 紫外灯下, 距离约 5 cm, 照射处理 6 h, 以未处理粗提液为对照测定抑菌活性, 重复 3 次; 向 1 mL 粗提液中加入蛋白酶 K, 使其终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 37°C 温育 3 h 后测定其抑菌活性, 分别以未处理粗提液和蛋白酶 K 为阴性对照和阳性对照, 重复 3 次。

5) 溶解性试验: 分别称取 0.1 mg 粗提物, 依次溶于 1 mL 的水、甲醇、乙醇、丙酮、正丁醇、氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙腈、石油醚等溶剂中, 超声波振荡均匀, 室温提取 12 h 后, 10000 r/min 离心 10 min, 测定上清液的抑菌活性, 重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 形态学分类

2.1.1 形态特征: EBS05 在 NA 培养基上生长良好, 菌落乳白色, 不产生色素, 没有荧光, 菌落不规则、

隆起, 表面形成不规则的褶皱。培养 24 d 后产生轻微腥臭味。细胞形状呈杆状。革兰氏染色阳性(G^+), 芽孢染色阳性。

2.1.2 生理生化特征: 生理生化特征试验结果如表 1 所示, 根据《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)^[7]和《常见细菌鉴定手册》^[8], EBS05 的形态特征和生理生化特征均符合枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的分类标准。生长温度范围的实验结果表明, EBS05 在低于 10°C 和高于 55°C 时均不能正常生长, 其最适生长温度为 30°C~32°C, 但是在 60°C 恒温恒湿条件下处理 30 min 后, 置于 30°C 恒温培养箱中培养时, 可迅速恢复正常生长, 其生长速率和菌落形态均不发生变化(数据略), 说明在保持一定湿度的条件下, EBS05 能耐受高温环境, 由此可见, EBS05 作为生防微生物资源开发时, 具有生产、储藏和应用上的优势。

2.2 16S~23S rRNA ISR 序列分析

菌株 EBS05 的 16S~23S rRNA ISR 测序结果如下:

```

1  TGGGTTGCCCCATTTCGGAATCTCCGGATCAAAGCTTGCTTACAGCTCCCCGAAG 55
56 CATATCGGTGTTTCGTCCTTCATCGGCTCCTAGTGCCAAGGCATCCACCGT 110
111 GCGCCCTTTCTAACTTAACCGTTAAAAAGAATCACTATGTGATATCTTGTTAC 165
166 TAATTGAATGTGATGTCTACTGTTATCTAGTTTTCAAAGAACACGTTTCGAAGGA 220
221 ATGATCCTTCAAACTAAACAAGACAGGGAACGTTCTGTTTATAAGACCCAAGGT 275
276 CTTATATTCCGTATAATATCCTTAGAAAGGAGGTGATCCAGCCGCACCTTCCGAT 330
331 ACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGG 385
386 CTCCTAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGCCG 440
441 GGCGGTGTGTGC 452

```

表 1 EBS05 的生理生化特征
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of EBS05

特性 Characteristics	结果 Results	特性 Characteristics	结果 Results
Catalase test	+	Nitrates reduction	+
Utilization of carbon sources-glucose	+	Nitrite reduction	-
Utilization of carbon sources-sucrose	+	Denitrification reaction	-
Utilization of carbon sources-lactose	-	Gelatin liquelaction	+
Oxidative glucose-fermentation	+	Dextrin production	+
Glucose-fermentation	+	Litmus-Milk test (4 d)	Acid producing
Anaerobic growth	-	Indole production	-
Lactose- fermentation	-	Litmus-Milk test (10 d)	Acid producing; Casein hydrolysis
V-P test	+	Growth pH range	4.0~10.0
Methyl red test	-	Optimum pH	7.0~8.0
Starch hydrolysis	+	Growth temperature range	10°C~50°C
3-ketonic group-lactose	-	Optimum temperature	30°C~32°C
Cellulose hydrolysis	-	Tolerance to NaCl concentration rang	<10%

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应。

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

该序列已向 GenBank 提交, 登录号为 DQ538309。将此序列与 GenBank 中核苷酸序列进行比对, 结果显示, 有 339 个与该序列匹配的同源序列, 同源性较高的芽孢杆菌主要包括 *Bacillus subtilis*、*Bacillus pumilus*、*Bacillus mycoides*、*Bacillus*

amyloliquefaciens、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus atrophaeus*、*Bacillus cereus*、*Bacillus megaterium*、*Bacillus thuringiensis* 和一株分离自环境样品的 Uncultured bacterium 等, 其系统进化树如图 1 所示。在 NCBI 中 Blast 结果显示, 该序列与数据库中发表

的枯草芽孢杆菌 16S~23S rRNA ISR 序列同源性均在 98% 以上, 其中, 与 *Bacillus subtilis* strain Tpb55 (DQ672263) 的同源性为 100%, 系统发育树上二者聚类在一起。综合上述形态学、生理生化特征以及 EBS05 和相关菌株 16S~23S rRNA ISR 序列同源性分析结果, EBS05 属于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.3 抗菌活性物质的理化性质

2.3.1 紫外吸收特性: EBS05 抗菌活性物质在 $\lambda 200\text{ nm} \sim 400\text{ nm}$ 间的紫外吸收光谱如图 2 所示。发酵液和粗提液均在 $\lambda 213.5\text{ nm}$ 处有最大吸收峰, 此为肽类和含苯环氨基酸的特征吸收峰, 提示在后续的 HPLC 分离纯化过程中, 可以选择 $\lambda 213.5\text{ nm}$ 为检测波长。从发酵液的紫外扫描图谱(图 2A)中可以看出, 在 $\lambda 260\text{ nm}$ 处有明显的吸收峰, 而粗提液则没有, 说明通过酸沉淀法, 可以有效地除去发酵液中的杂蛋白, 而活性组分的抑菌活性不受影响, 且浓缩和初步纯化效果较好。

2.3.2 酸碱稳定性: 试验结果见表 2。EBS05 代谢活性物质在 pH 5.0~8.0 范围内抑菌活性稳定。当

pH>9.0 时, 其抑菌活性明显降低, 至 pH 11.0 以上时, 活性完全丧失; 当 pH<4.0 时, 活性物质逐渐沉淀, 上清液的抗菌活性随之降低, 至 pH 2.0 时, 活性物质完全沉淀, 上清液无抑菌活性。将沉淀用双蒸水(pH 2.0)洗涤后, 再用同体积 70% 甲醇溶解, 其抑菌活性与未处理粗提液活性相当(数据略)。因此, 抑菌活性物质在酸性条件下可产生可逆的沉淀现象, 而在强碱性条件下, 抑菌活性降低。由此可见, 在作为菌剂使用时应该避免在强酸或强碱性条件下储藏和使用。

2.3.3 热稳定性: 试验结果如表 3 所示。抗菌活性物质在 $60^{\circ}\text{C} \sim 80^{\circ}\text{C}$ 处理 2 h, 其活性保持不变, 90°C 处理 2 h 和湿热灭菌($1 \times 10^5\text{ Pa}$)处理 10 min 后, 其抗菌活性分别降低了 11% 和 12%, $1 \times 10^5\text{ Pa}$ 处理 30 min 后, 其抗菌活性仍然保持在 65% 以上, 说明抗菌活性物质具有较强的热稳定性。

2.3.4 抑菌物质对紫外线、蛋白酶 K 的稳定性: 试验结果表明, 抗菌活性物质分别经紫外线照射 6 h 和蛋白酶 K 处理 3 h 后, 其抑菌活性不变(见图 3、图 4), 说明 EBS05 抗菌活性物质对紫外线和蛋白酶

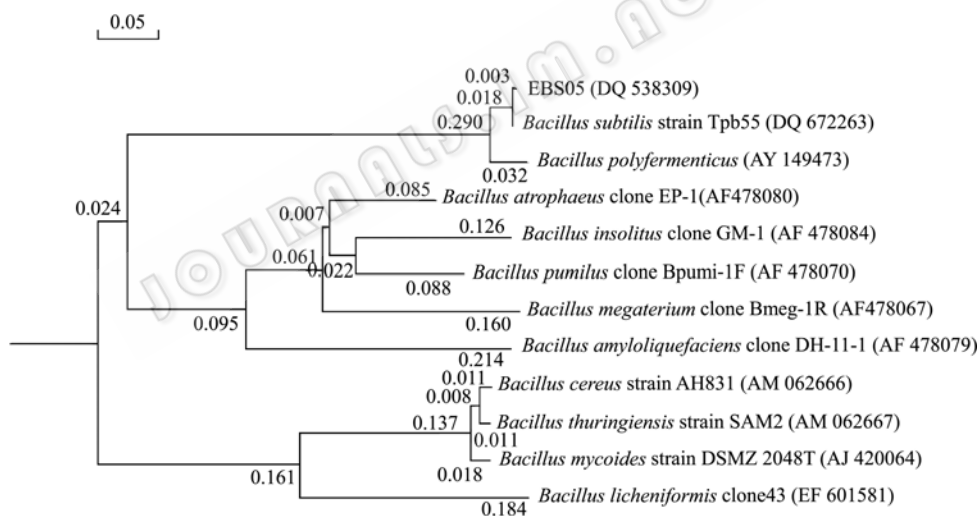


图 1 内生细菌 EBS05 与基因库中相关菌株的系统发育树
Fig. 1 Dendrogram analysis of ISR sequences from endophytic bacteria EBS05 and relative bacteria strains from NCBI GenBank

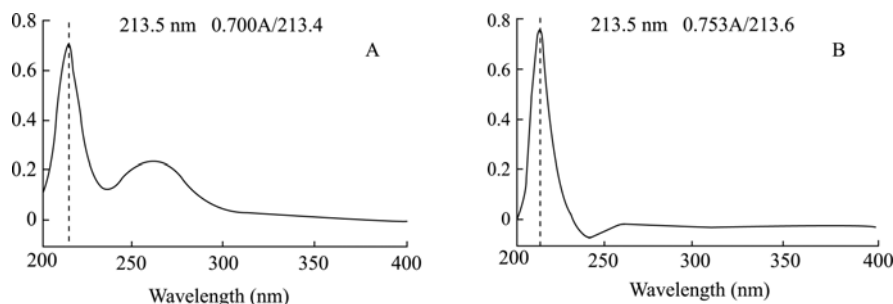


图 2 发酵液和粗提物的紫外吸收图谱
Fig. 2 UV absorption spectrum of fermented broth and crude extraction

Note: A: Fermented broth; B: Crude extraction.

表 2 不同 pH 条件下粗提物抗菌活性的变化											
Table 2 Antimicrobial activity of crude extraction under different pH conditions											
pH value	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0
Diameter of inhibition (mm)	0	12.0	16.0	19.0	20.0	20.0	20.0	16.0	10.0	0	0

表 3 不同温度 and 不同处理时间对粗提物抗菌活性的影响						
Table 3 Effect on antimicrobial activity of crude extraction treated with different temperature and time						
温度 Temperature (°C)	处理时间 Treated time (min)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)			平均值 Mean*(mm)	相对抑菌率 Relative inhibitory activity (%)
Room temperature	0 (CK)	19.5	20.2	19.8	19.8 a	100
60	120	19.4	20.0	19.6	19.7 a	100
70	120	19.5	19.8	19.6	19.6 a	99
80	120	19.5	19.6	19.5	19.5 a	99
90	120	17.7	17.9	17.3	17.6 b	89
121	10	17.6	17.9	17.1	17.5 b	88
121	20	15.4	15.5	15.2	15.3 c	77
121	30	13.3	13.5	13.2	13.3 d	67

Note: *: Different letters in the same column show significant difference ($P=0.05$) among the different treatments.

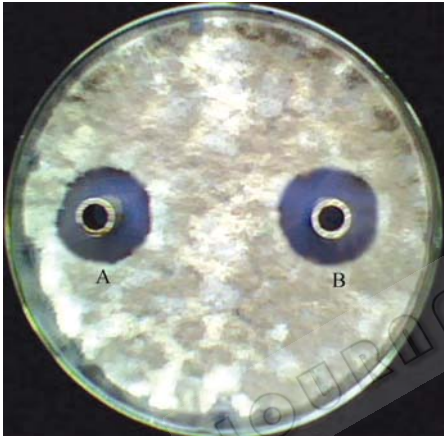


图 3 紫外线照射对粗提物抗菌活性的影响
Fig. 3 Effect of ultraviolet radiation on antimicrobial activity of crude extraction
Note: A: Crude extraction; B: Treated by UV.

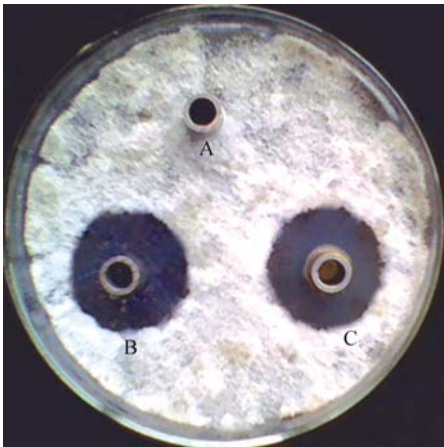


图 4 蛋白酶 K 对粗提物抗菌活性的影响
Fig. 4 Effect of protease K on antimicrobial activity of crude extraction
Note: A: Protease K; B: Treated by protease K; C: Crude extraction.

K 稳定。
2.3.5 抑菌物质的溶解性: 实验结果如图 5 所示, EBS05 产生的抗菌活性物质具有较好的醇溶性, 易溶于甲醇、乙醇, 可溶于水、丙酮和正丁醇, 微溶于氯仿和二氯甲烷, 不溶于乙酸乙酯、乙腈和石油醚等有机溶剂, 以上结果为色谱法纯化抗菌活性物质时选择适宜的层析剂提供了理论依据。

3 讨论

植物内生菌生物学特性的研究是早期内生菌研究的主要内容, 但由于内生菌长期生活在植物组织内部并与宿主植物协同进化, 其形态特征必然发生一定的变化以适应其内生环境, 经典的形态学分类标准是否能准确反映其分类地位是一个值得探讨的问题^[12], 因此, 在植物内生菌的分类鉴定方面, 分子分类学技术的应用是不可或缺的。在细菌分子系统学方面, 16S rRNA序列分析被称为细菌分类鉴定的“Gold standard”^[13,14]。但是, 由于 16S rRNA序列在原核生物中的高度保守性以及相近种、亚种或同一种内不同菌株之间的鉴别分辨率低等方面的局限性, 因此 16S~23S rRNA ISR以其无特定功能和进化速率比 16S rRNA大 10 倍而成为细菌种间、亚种间甚至株间分类和鉴定的新热点^[15,16]。本研究在明确EBS05 的形态学和生理生化特征的基础上, 通过 16S~23S rRNA ISR序列分析, 证明樟树内生细菌 EBS05 为枯草芽孢杆菌。基于植物内生菌可产生与宿主植物相同或相似的生物活性物质^[1,12], 从樟树体内分离的、对多种植物病原菌具有拮抗活性内生细菌

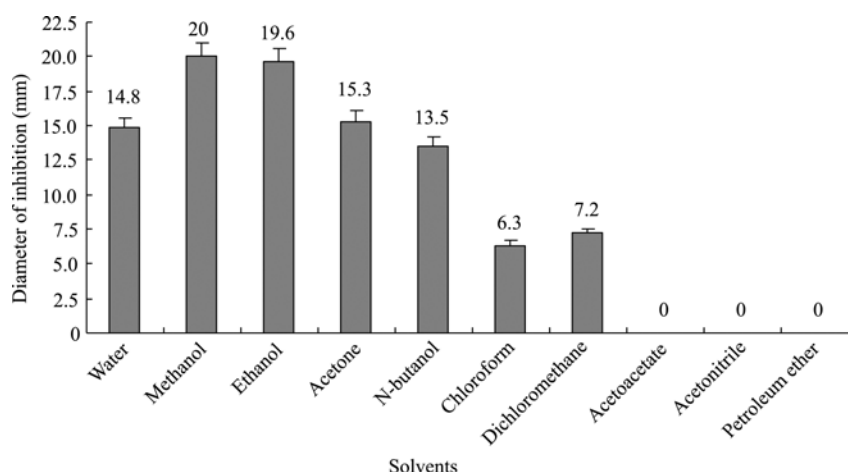


图 5 粗提物在不同有机溶剂中的溶解性

Fig. 5 Solubility of crude extraction in different organic solvents

的代谢产物中筛选活性物质是一项极有价值的探索。

EBS05 不仅对多种植物病原真菌有一定的拮抗活性, 而且其代谢活性物质对植物病毒(TMV)有很强的抑制作用, 显示出良好的生防潜力^[5]。我们的前期研究工作结果表明, 在EBS05 防治植物病害过程中, 其代谢活性物质发挥着重要作用, 因此, 研究其代谢活性物的理化性质, 不仅能为正确选择活性成分分离纯化工艺提供理论依据, 而且为该内生菌的进一步研究和开发利用奠定了基础。如抗菌活性物质的紫外吸收特性、溶解性、酸碱稳定性等是正确选择分离纯化条件的基础。鉴于活性物质良好的热稳定性和在pH 2.0 时可完全沉淀的特点, 在发酵液预处理时, 可以考虑短时间的高温处理后, 再过滤或离心, 然后用酸沉淀法获得目的活性物质的粗提物, 这样既可以有效除去糖、蛋白质等大分子杂质, 同时也可以大大降低产品后处理成本。抗菌活性物质对蛋白酶和紫外线的稳定性, 将其作为生物防治药剂开发并能持久稳定地发挥防病作用提供保证。以上研究结果对该活性化合物的结构鉴定、防病机理以及菌剂研制等方面的研究工作具有重要的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Strobel G, Daisy B, Castillo U, *et al.* Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 2004, **67**(2): 257–268.
- [2] 吴芳婷, 陈代杰, 钱秀萍. 植物内生菌生物活性物质研究新进展. *中国抗生素杂志*, 2004, **29**(3): 184–192.
- [3] 韩继刚, 宋 未. 植物内生细菌研究进展及其应用潜力. *自然科学进展*, 2004, **14**(4): 374–379.
- [4] 赵玉华, 张书萍, 文才艺. 一株樟树内生防细菌的分离. *襄樊学院学报*, 2007, **28**(11): 28–31.
- [5] 尹志刚, 文才艺, 陈建光. 樟树内生细菌 EBS05 代谢活

性物质的分离纯化及其抗病毒活性的研究. In: 中国植物病理学会 2008 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008, p.583.

- [6] 方中达. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [7] 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(4): 945–952.
- [10] Shaver YJ, Nagpal ML, Fox KF, *et al.* Variation in 16S–23S rRNA intergenic spacer regions among *Bacillus subtilis* 168 isolates. *Molecular Microbiology*, 2001, **42**(1): 101–109.
- [11] 陈年春. 农药生物测定技术. 北京: 北京农业大学出版社, 1991, pp.167–186.
- [12] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题. *生态学杂志*, 2004, **23**(2): 86–91.
- [13] Catherine J Mullie. Use of 16S rRNA gene sequence for the description of new species. In: Peter A. McNamara. Trends in RNA Research. Nova Publishers, 2006, pp.270–272.
- [14] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 1994, **44**: 846–849.
- [15] Nguimbi E, Li YZ, Gao BL, *et al.* 16S–23S ribosomal DNA intergenic spacer regions in cellulolytic myxobacteria and differentiation of closely related strains. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, **26**(2): 262–268.
- [16] Nagpal ML, Fox KF, Fox A. Utility of 16S–23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms? *Journal of Microbiological Methods*, 1998, **33**(3): 211–219.