PCR-DGGE 技术在微生物物种多样性研究中的局限性及其解决措施

马俊孝，季明杰，孔　健*
(山东大学 微生物技术国家重点实验室，山东 济南　250100)

摘　要：变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE)技术目前已经成为研究微生物物种多样性和动态变化的分子检测工具之一。该技术不依赖于微生物的分离培养，便能快速、准确地获取复杂样品中微生物的菌群组成及其遗传信息，因此被广泛应用于微生物生态学、食品微生物学等领域。但DGGE技术存在一定的局限性，有时会造成分析结果的偏差。本文简单概述了DGGE技术的基本原理及其在微生物群落分析中的应用，重点对造成DGGE结果偏差的因素，如DNA提取、PCR扩增、DGGE条件以及DGGE图谱分析等进行讨论，并提出相应的解决措施，旨在对DGGE检测结果的分析提供参考。
关键词：变性梯度凝胶电泳；微生物多样性；微生物生态学；PCR；局限性

Overview of Limitation and Improving Methods of PCR-DGGE in Microbial Diversity Study

MA Jun-xiao，JI Ming-jie，KONG Jian*
(State Key Laborotory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan　250100, China)

Abstract：Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) technique has been proven to be a powerful tool for analyzing microbial communities and their dynamics changes. As a fast and reliable molecular method, DGGE is used widely to investigate the microbial component and structure of complex communities without isolation and cultivation processes. However, potential causes resulting in limitations in DGGE analysis can be sometimes met. In this paper, the principle and application aspects, as well as the limitation of DGGE techniques for microbial ecology analysis were introduced, and the main causing factors addressed and discussed, such as DNA extraction, PCR amplification, DGGE conditions optimization, and DGGE profile analysis.
Key words：DGGE；microbial diversity；microbial ecology；PCR；limitations
中图分类号：Q939.97　　文献标识码：A　　文章编号：1002-6630(2008)05-0493-05

对于微生物物种多样性的分析传统上主要依赖于经典的培养技术，即经过菌株分离纯化、形态观察、生理生化特征等环节获得部分信息后再进行菌株分类鉴定。该过程步骤繁琐、工作量大，而且对于生理生化特性相似的菌株，仅凭这些特征难以正确区别和鉴定，并且生态环境中不可培养的微生物易被遗漏[1-2]。近几年，逐步发展起来的分子生物学技术克服了经典培养方法的不足以及引起种群丢失等的缺陷，可以更可靠、更快速地获得环境样品中各种微生物的菌落指纹和特征性核苷酸序列以确定微生物的多样性及其分类地位，揭示和丰富了生态环境的微生物资源。

变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE)技术已经发展成为研究微生物群落组成及亲缘关系的主要分子工具之一[3-4]，它不依赖于培养过程，大大缩短了样品的分析时间，而且还能显示环境样品中不可培养的微生物的遗传信息，因此，DGGE技术在微生物多样性研究中发挥了重要作用。但是DGGE技术的应用存在一定的局限性，有时造成检测结果的偏差。本文简述PCR-DGGE技术的原理及其在微生物生态学中的应用，重点对PCR-DGGE技术在复杂样品的微生物群落分析中造成结果偏差的原因进行归纳和讨论，并提出相应的解决方法，以便对以后的DGGE结

收稿日期：2007-04-02
基金项目：国家“863”高技术研究发展计划项目(2006AA10Z344；2006AA10Z321)
作者简介：马俊孝(1978-)，男，硕士研究生，研究方向为食品微生物学。E-mail：jx·m@mail.sdu.edu.cn
*通讯作者：孔健(1964-)，女，教授，博士，研究方向为应用微生物。E-mail：kongjian@sdu.edu.cn

果分析提供帮助。

1　DGGE 原理

一般的聚丙烯酰胺凝胶电泳能将大小不同的DNA分子进行分离，但是对于大小相同碱基序列不同的DNA片段因其具有相同的迁移行为而不能被分开。鉴于此，DGGE技术在一般聚丙烯酰胺凝胶电泳的基础上添加了呈梯度分布的变性剂(如尿素和甲酰胺)，使双链DNA分子迁移到一定的变性剂浓度并达到其解链温度时，便开始部分解链。而部分解链的DNA分子其迁移率随解链程度增大而减小，从而使序列不同大小相近的DNA片段滞留于凝胶的不同位置，形成相互分开的谱带[3-5]。

2　DGGE 技术在微生物生态学中的应用

DGGE技术对微生物多样性的分析不依赖于微生物的培养过程，而是直接提取环境样品中总的DNA，由此包括了样品中可培养微生物和不可培养微生物的总遗传信息，从而真实地反映了微生物群落的原始组成。自1993年Muyzer等人首次将DGGE技术应用于微生物生态群落结构的研究后，迅速扩展到微生物分子生态学研究的各个领域，如土壤[6-7]、肠道[8]、温泉[9]、海洋[10]、根际等生态环境，目前在发酵食品的微生物检测及质量控制中也显示出很好的应用潜力[11-14]。有关DGGE技术的应用已有很多报道，本文不再做详细概述。

3　造成 DGGE 结果偏差的因素及其解决措施

理论上，只要选择的电泳条件如变性剂梯度、电泳时间、电压等适当，DGGE 技术便可区分一个碱基差异的DNA片段[15]。但是在DGGE实际操作中通常包括：样品的预处理、样品总DNA的提取、样品靶基因(如16S r DNA基因片段)的PCR扩增、扩增产物的DGGE分析等步骤，每一环节的操作均有可能造成分析结果的偏差，以致最终导致分析结果的不准确。造成结果偏差的因素可以归纳为以下几个方面。

3.1　环境样品中总DNA提取

PCR-DGGE技术是建立在环境样品的总遗传信息分析的基础上，因此DNA提取质量的好坏，直接影响着后续分子实验操作。然而对于复杂环境样品DNA提取通常需要经过样品预处理、细胞裂解、DNA沉淀等环节，以上过程易造成菌种数量的改变和DNA含量的变化，由此引起分析偏差[16]。

3.1.1　样品的预处理

环境样品组成复杂，除含有微生物细胞外，还含有复杂的有机物质和无机盐类，这些杂质去除不干净，将会对DNA后续分析产生重大影响。环境样品总DNA提取方法可概括为两类：间接法和直接法[17-18]。间接提取法是先经过梯度离心、离心洗涤等步骤去除样品中的杂质，然后再收集细胞和裂解细胞，该过程容易造成微生物种类和数量的丢失；而直接法是不去除杂质直接对样品处理以使细胞裂解，该操作不可避免地造成环境样品中杂质(主要是腐殖酸和多糖)对DNA的污染，进而影响后续的分子操作。

3.1.2　裂解细胞

环境样品中存在的微生物种类繁多，生理状态各异，细胞壁结构和组成也不同(如革兰氏阳性菌和阴性菌)。为使提取的DNA分子具有代表性，必须保证所有微生物细胞无选择性地裂解而释放出核酸物质。目前裂解环境样品微生物细胞的方法有：酶法、化学法和机械法以及3种方法的有机结合。大量实验证明，微珠振荡法能彻底破坏样品结构，从而得以最大限度的触及整个细菌群落，包括深藏在样品微穴中的细菌，而且对细胞无选择性，是一种方便且有效细胞裂解方法[19-21]。

3.1.3　DNA的获取

环境样品总DNA提取质量的高低多以获得量大、能用于后续分子操作和尽可能地包含样品中所有微生物类群的遗传信息为指标。DNA提取过程中一般用乙醇、异丙醇和聚乙二醇(PEG)等有机溶剂沉淀DNA分子，这些有机溶剂对环境样品的DNA均有一定的优先选择性。Porteous等[22]认为肝糖原有助于提高DNA的涵盖面从而减少遗漏。

环境样品中微生物种类和数量存在差异，为了尽可能多地包含劣势微生物的遗传信息，需要针对样品的理化性质和生物学特性采取适当的提取方法和对现有方法进行改进，以得到高质量的DNA。

3.2　PCR扩增

利用DGGE技术分析微生物群落组成时，通常结合PCR技术，即通过PCR扩增产物的指纹图谱反映微生物群落组成的有关信息。但是PCR技术自身也存在诸多不足，具体表现在以下几个方面。

3.2.1　扩增效率的差异

采用细菌通用引物、以提取的混合DNA为模板，扩增16S rRNA上的靶基因时，其扩增几率不均等，而是存在基因优先扩增现象，即所谓的基因扩增偏嗜性。邢德峰等[23]利用PCR-DGGE技术分析活性污泥的微生物组成时发现，采用的引物不同，其PCR-DGGE指纹谱带存在明显差异。笔者以等量混合的乳酸菌染色体DNA为模板，采用细菌通用引物和乳酸菌专用引物分别扩增16S rRNA的V3可变区域，其扩增产物在DGGE胶板上虽然谱带数相同，但谱带明暗程度明显不同。采

用降落PCR技术能增加引物对模板的识别特异性，降低基因扩增的偏嗜性。此外，选用多对引物同时对混合DNA进行PCR-DGGE分析也能补救扩增偏嗜性造成的偏差[21, 24-25]。

3.2.2 PCR人工产物

利用PCR扩增复杂样品的靶基因时，因DNA聚合酶识别的错误、DNA点突变等原因，可能会产生一些人工序列(artifactual sequence)，如嵌合体(chimeras)、异源双链(heteroduplexes)和单链DNA等[26]，这些人工序列在DGGE凝胶板上的出现，致使对样品中微生物种类评估过高。通过重复PCR或对谱带序列测定可以排除嵌合体，异源双链产生的几率要比嵌合体低，PCR扩增产生的单链DNA在进行垂直DGGE时将形成横贯于“S”形曲线陡峭部分的亮线而得以区别。

3.2.3 “GC夹板”技术

在DNA分子中G、C碱基对比A、T碱基对结合牢固，G、C含量高的区域具有较高的解链温度，为区别序列差异发生在最高解链温度区域的DNA片段，使用了“GC 夹板”(GC-clamp)。所谓“GC夹板”是将一段长度为30～50bp富含G、C的DNA序列连接到双链的一端以形成一个人工高温解链区，使DNA片段的原有部分处在低温解链区从而实现更好的分离。罗海峰等[27]在研究土壤微生物多样性时，使用GC夹板后，PCR产物在DGGE胶板上的分离效率大大提高。

3.2.4 DNA聚合酶的影响

目前用于PCR反应中的DNA聚合酶有多种，性质差异很大。DNA聚合酶的质量和保真性对扩增产物产生较大影响，罗海峰[28]等人利用DGGE比较了Taq DNA聚合酶、Tsg DNA聚合酶和Pfu DNA聚合酶对PCR扩增产物的忠实性，结果以Pfu DNA聚合酶的扩增效果最好。

3.2.5 靶基因的拷贝数

16S rRNA基因是目前用于菌株鉴定的主要分子指征，过去DGGE分析多选用16S rRNA的可变区域，由于16S rRNA基因在染色体上存在多个拷贝，致使同一种细菌在DGGE图谱中可能出现多条带，由此高估了样品中微生物的种类。为了减少基因拷贝数的影响，Rantsiou和Renouf选用单拷贝的RNA聚合酶亚单位基因rpoB作为靶基因，对食品发酵中乳酸菌的菌群组成和菌群的适时变化进行分析，避免了基因拷贝数的影响，收到了很好的实验效果[29-30]。此外，PCR扩增时，模板浓度[31]和模板被污染的程度[32]，也会导致PCR扩增结果的差异。

3.3 DGGE技术相关参数

DGGE技术的检测还与实验条件，如变性剂浓度梯度和电泳时间有关。尽管目前有些软件能够预测和模拟靶基因的解链性质[5]，但与实际操作还有一定的偏差，仍然需要根据实际情况摸索具体的实验条件。

3.3.1 变性剂梯度的选择

在进行DGGE实验前，首先通过垂直变性梯度电泳了解DNA分子的解链性质，以确定变性剂浓度梯度。所谓垂直变性梯度电泳，即电泳方向与变性剂梯度线性增加的方向垂直，在聚丙烯凝胶板上变性剂梯度是从左到右梯度增加，加样孔是一个占胶板整个宽度的单一大孔(与梯度方向平行)。电泳后经染色，凝胶板上呈现出一条清晰的“S”型曲线，如图1所示(笔者实验结果，待发表)。在曲线中出现的陡峭跃迁的位置显示了有关DNA片段解链区域的数目及相对TM值(变性剂浓度)，以电泳条带能否被分开来确定合适的变性剂范围。

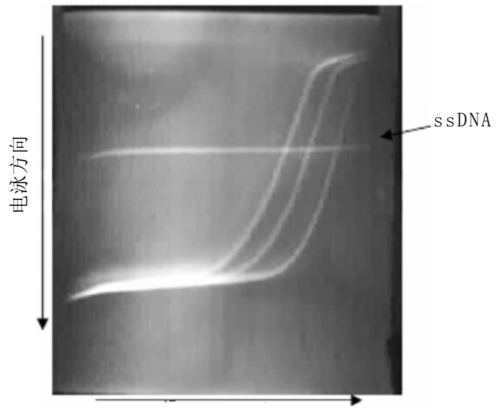

图1 确定DGGE变性剂浓度梯度的垂直电泳图谱

Fig.1 Profile of perpendicular DGGE for determining denaturant agent concentration

3.3.2 电泳时间的确定

电泳时间与DNA片段的大小、凝胶浓度、凝胶规格、变性剂梯度、以及系统电压等参数有关。一般在既定规格的胶板上，电泳时间与电压密切相关，电压越低，电泳时间越长。在凝胶规格、电压一定的情况下，通过垂直电泳确定合适的变性剂浓度梯度后，再进行变性剂呈线性梯度增加、方向与电泳方向一致的平行DGGE确定电泳时间。电泳时间的确定采用时间间歇(time-travel)加样法，即每隔一定时间加一次样品。如图2所示，从而使样品的电泳时间有一个梯度，根据电泳结果，样品获得最大分辨率的时间即为最佳电泳时间 。

3.4 染色及DGGE图谱分析

与琼脂糖凝胶电泳一样，DGGE胶板上的DNA谱带通过染色后才能观察。常用的染色剂有溴化乙啶(ethidium bromide, EB)、SYBR Green I、SYBR Gold和银。EB染色是最常用的方法，该方法操作简单，但聚

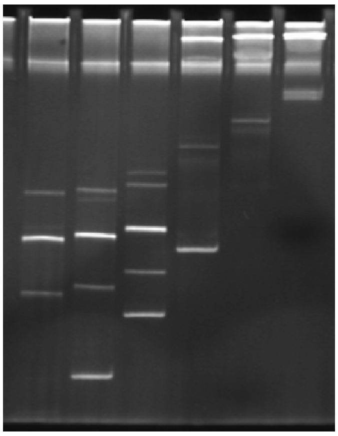

图2 确定DGGE电泳时间的水平电泳图谱
Fig.2 Profile of time-travel DGGE for determining time

丙烯酰胺对EB有熄灭作用，致使灵敏度低，导致低估环境样品中微生物的种类。SYBR Green I、SYBR Gold染色，灵敏度高，能更好的消除染色背景，但是SYBR染料价格昂贵。EB和SYBR染料只对双链DNA着色，单链DNA几乎不显色。银染法单、双链DNA均能着色，其缺点是不能用于后续的分子操作[5,33]。

有时染色后的DNA谱带强度较弱或不很清晰，可以加大DNA的进样量。鉴于凝胶进样孔的容量有限，可以对PCR产物浓缩后进样。在观察和比较DGGE指纹图谱时，对于明亮程度差异的谱带，在排除点样误差外，还应考虑基因扩增效率的偏嗜性。

3.5 共迁移

若选用的实验条件不当，则可能会出现不同序列DNA片段发生共迁移的现象[34-35]，即同一条带含有不同种类细菌的现象，这样就低估了环境样品中的微生物种类。降低共迁移发生的措施一是选用不同引物扩增目的基因，然后比较DGGE谱带的差异，另一种方法是对相应的DGGE条带割胶后用不带GC序列的引物进行扩增，其PCR产物序列测定后验证。

4 展 望

尽管DGGE技术本身存在一些不足有待完善，但该技术具有重复性高、快速和容易操作等优点，能够弥补传统方法的不足，已经成为微生物学领域的重要研究手段。最近，在DGGE基础上发展起来的双梯度DGGE(double-gradient denaturing gradient gel electrophoresis, DG DGGE)[36-37]、依赖培养的DGGE(culture-dependent gradient denaturing gradient gel electrophoresis, CD DGGE)[38-39]等，能使DNA形成的谱带更清晰、更真实，因此，在对复杂环境样品的微生物多样性研究中仍然是一种很好的技术手段。

参考文献：

[1] BORNEMAN J, SKROCH P W, O'SULLIVAN K M, et al. Molecular microbial diversity of an agriculture soil in Wisconsin[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(6): 1935-1943.

[2] AMANN R I, LUDWING W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev, 1995, 59(1): 143-169.

[3] MUYZER G, SMALLA K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73(1): 127-141.

[4] MUYZER G. DGGE/TGGE: a method for identifying genes from natural ecosystems[J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(3): 317-322.

[5] 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE技术及其在微生物分子生态学中的应用[J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 845-848.

[6] GOMES N C M, FAGBOLA O, COSTA R, et al. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(7): 3758-3766.

[7] SMALLA K, WIELAND G, BUCHNER A, et al. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shift revealed[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(10): 4742-4751.

[8] WALTER J, TANNOCK G W, TILSALA-TIMISJARVI A, et al. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(1): 297-303.

[9] FERRIS M J, MUYZER G, WARD D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2): 340-346.

[10] TESKE A, WAWER C, MUYZER G, et al. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragment[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(4): 1405-1415.

[11] MEROTH C B, WALTER J, HERTEL C, et al. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Appl Envir Microbiol, 2003, 69(1): 475-482.

[12] FLOREZ A B, MAYO B. PCR-DGGE as a tool for characterizing dominant microbial populations in the Spanish blue-veined cabrales cheese[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(10): 1205-1210.

[13] FASOLI S, MARZOTTO M, RIZZOTTI L, et al. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 82(1): 59-70.

[14] TEMMERMAN R, SCHEIRLINCK I, HUYS G, et al. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 220-226.

[15] MYERS R M, FISCHER S G, LERMAN L S, et al. Nearly all single base substitution in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13(9): 3131-3145.

[16] ROCHELLEA P A, CRAGG B A, FRY J C, et al. Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis[J]. FEMS Microbiol Ecology, 1994, 15(1-2): 215-226.

[17] ROBE P, NALIN R, CAPELLANO C, et al. Extraction of DNA from soil[J]. European Journal of Soil Biology, 2003, 39(4): 183-190.

[18] ROOSSE-AMSALEG C L, GARNIER-SILLAM E, HURRY M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples[J]. Applied Soil Ecology, 2001, 18(1): 47-60.
[19] MAARIT N R, HEISKANEN I, WALLENIUS K, et al. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortiav[J]. J Microbiol Methods 2001, 45(3): 155-165.
[20] MILLER D N, BRYANT J E, MADSEN E L, et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(11): 4715-4724.
[21] GUAN L L, HAGEN K E, TANNOCK G W, et al. Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(11): 6750-6757.
[22] PORTEOUS L A, SEIDLER R J, WATRUD L S. An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications[J]. Mol Ecol, 1997, 6(8): 787-791.
[23] 邢德峰, 任南琪, 宋佳秀, 等. 不同16S rDNA靶序列对DGGE分析活性污泥群落的影响[J]. 环境科学, 2006, 27(7): 1424-1428.
[24] FONTANA C, VIGNOLO G, COCCONCELLI P S. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages[J]. J Microbiol Methods, 2005, 63(3): 254-263.
[25] HEILIG H G H J, ZOETENDAL E G, VAUGHAN E E, et al. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(1): 114-123.
[26] SPEKSNIJDER A, KOWALCHUK G A, DE J S, et al. Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(1): 469- 472.
[27] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. 在PCR-DGGE研究土壤微生物多样性中应用GC发卡结构的效应[J]. 生态学报, 2003, 23 (10): 2170-2175.
[28] 罗海峰, 齐鸿雁, 张洪勋. 不同DNA聚合酶对PCR-DGGE研究土壤微生物多样性的影响[C]//第五届微生物生态学术研讨会会议论文, 2003: 41- 47.
[29] RANTSIOU K, COMI G, COCOLIN L. The rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics duringfood fermentations[J]. Food Microbiology, 2004, 21(4): 481-487.
[30] RENOUF V, CLAISSE O, MIOT-SERTIER C, et al. Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis[J]. Food Microbiology, 2006, 23(2): 136-145.
[31] CHANDLER D P, FREDRICKSON J K, BROCKMAN F J. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries[J]. Mol Ecol, 1997, 6(5): 475-482.
[32] TANNER M A, GOEBEL B M, DOJKA M A, et al. Specific rDNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(8): 3110-3113.
[33] SANGUINETTI C J, DIAS NETO E, SIMPSON A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polycrylamide gels [J]. Biotechniques, 1994, 17(5): 914-921.
[34] SEKIGUCHI H, TOMIOKA N, NAKAHARA T, et al. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(15): 1205-1208.
[35] YANG C H, CROWLEY D E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(1): 345-551.
[36] 陈桐生, 李建军, 岑英华, 等. DG-DGGE分析除臭生物滤池微生物多样性及富集后的种群结构差异[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12 (1): 113-117.
[37] JAMES J B, SHERMAN T D, DEVEREUX R. Analysis of bacterial communities in seagrass bed sediments by double-gradient denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA genes[J]. Microb Ecol, 2006, 52(4): 655-661.
[38] EDENBORN S L, SEXSTONE A J. DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analyses [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(7): 1570-1579.
[39] 孙晓棠, 姚青, 刘琼光, 等. 利用DGGE评价不同培养基回收番茄根际细菌类群的能力[J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 482-486.