

造纸法再造薄片浆料中腐败菌的分离鉴定与抑菌研究

薛长森¹, 迟建国¹, 高颖¹, 田海龙¹,
李刚¹, 李晓华¹, 陈茂深², 钟芳²

(1. 山东瑞博斯烟草有限公司, 山东 临沂 276400; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用平板划线分离方法对造纸法再造烟叶上网浆中的主要微生物群进行分离, 再根据细菌的菌落形态、菌体形态、生理生化实验和 16S rDNA 序列分析对菌株进行了鉴定。结果表明, 引起造纸法再造烟叶上网浆腐败变质的主要菌群为约氏不动杆菌和恶臭假单胞菌。此外, 还考察了山梨酸钾、双乙酸钠、尼泊金酯钠、乙二胺四乙酸二钠和 ϵ -聚赖氨酸等 5 种防腐剂对这两种腐败菌的抑菌效果。结果表明 5 种防腐剂的抑菌效果强弱顺序为 ϵ -聚赖氨酸 > 乙二胺四乙酸二钠 > 尼泊金酯钠 > 双乙酸钠 > 山梨酸钾, 其中 ϵ -聚赖氨酸对约氏不动杆菌和恶臭假单胞菌的最小抑菌质量浓度分别为 0.075 mg/mL 和 0.05 mg/mL。

关键词: 细菌; 分离; 鉴定; 抑菌

中图分类号: TS41 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)10—1089—06

Isolation, Identification and Bacteriostasis of Spoilage Bacteria in Pulp of Paper-Making Reconstituted Tobacco Sheet

XUE Changsen¹, CHI Jianguo¹, GAO Ying¹, TIAN Hailong¹,
LI Gang¹, LI Xiaohua¹, CHEN Maoshen², ZHONG Fang²

(1. Shandong Rebirth Tobacco Co., Ltd, Linyi 276400, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this paper, the streak plate separation method was used to classify and identify the primary bacterial flora in the pulp of paper-making reconstituted tobacco sheet according to colony shape, bacterial characteristics, physio-biochemical tests as well as 16S rDNA sequence analysis. The results indicated that the spoilage bacteria in the pulp of paper-making reconstituted tobacco sheet were *Acinetobacter johnsonii* and *Pseudomonas* sp. Besides, the antibacterial effects of five food preservatives (potassium sorbate, sodium diacetate, butylparaben sodium, EDTA-2Na and ϵ -polylysine (ϵ -PL)) on the spoilage bacteria were evaluated. The results revealed that these five preservatives could be ranked in decreasing order of antibacterial activity as follows: ϵ -PL > EDTA-2Na > butylparaben sodium > sodium diacetate > potassium sorbate. The minimal inhibitory

收稿日期: 2014-07-14

基金项目: 中国烟草总公司科技面上项目(中烟办(2012)122号); 山东中烟工业有限公司重点项目(201101003)。

作者简介: 薛长森(1963—), 男, 山东临沂人, 工程师, 主要从事造纸法再造烟叶产品研发及工艺技术研究。

E-mail: rebirthxue@126.com

concentrations of ϵ -PL to *Acinetobacter johnsonii* and *Pseudomonas putida* were 0.075 and 0.05 mg/mL, respectively.

Keywords: bacteria, isolation, identification, bacteriostasis

从烟叶采收后的初加工到制造出包装好的卷烟成品的整个过程中,会产生大约占原料总量三分之一的烟梗和烟末等烟草碎屑^[1],而这些碎屑无法在制备香烟时直接加入。此外,在烟叶收获过程中也会产生约5%的次级烟叶^[2]。如果将烟草碎屑和次级烟叶这些烟草下脚料合理地利用起来,对于降低生产成本,降低烟草行业的原料消耗,提高产品的品质和节约耕地具有十分重要的意义。多年来,烟草行业就上述问题进行了大量的研究,结果发现再造烟叶是实现废烟料综合利用的有效途径。目前,再造烟叶的生产方法主要有辊压法、稠浆法和造纸法三种。与其他两种方法相比,造纸法再造烟叶具有密度小、填充值高、成丝率高、机械加工性能好和焦油含量低等优点^[3],因此已广泛应用于再造烟叶的生产加工过程中。在造纸法再造烟叶生产加工过程中,原料经水浸泡后,将可溶物与不溶物萃取分离,不溶物一般会与木浆纤维混合打浆,然后再采用抄纸机制得片基^[4]。

研究发现,烟草中富含葡萄糖、果糖、脯氨酸和蛋白质^[5]等微生物生长繁殖所需的碳源和氮源,因此腐败微生物极易在浆料中生长繁殖,致使浆料腐败变质,影响纸基的物理性能,从而进一步影响再造烟叶的整体品质。此外,由于腐败菌的繁殖,致使抄造后的白水循环使用的次数大大降低,造成水资源的大量浪费,同时也增加了后续污水处理的压力。然而,迄今为止并没有发现造纸法再造烟叶浆料中腐败微生物的相关报道。作者对造纸法再造烟叶浆料中的腐败微生物进行了分离鉴定,同时考察了5种广谱防腐剂对腐败菌的抑菌效果,确定了它们的最小抑菌浓度,从而为造纸法再造烟叶的浆料防腐提供相关的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂试剂和仪器

新鲜的造纸用浆料采自山东瑞博斯烟草有限公司的薄片生产线;山梨酸钾和双乙酸钠均为食品级,北京北方霞光食品添加剂有限公司;尼泊金酯

钠,徐州冬荷科技有限公司;乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na):中国医药集团上海化学试剂公司; ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL):浙江银象生物工程有限公司;LB培养基:胰蛋白胨 10 g,NaCl 10 g,酵母膏 5 g,蒸馏水 950 mL,pH 7.0,121 °C 湿热灭菌 30 min;营养琼脂培养基。

1.2 仪器与设备

320-S pH 计:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品;基因组 DNA 快速抽提试剂盒(细菌):生工生物工程(上海)有限公司产品;PYX-DHS 隔水式恒温培养箱,上海一恒科技有限公司产品;GS00001 PCR 仪:G-STROM 产品;Power pac 核酸电泳仪:Bio-Rad Laboratories 产品;Geldoc 2000 凝胶成像系统:Bio-Rad Laboratories 产品;DK-8D 型电热恒温水浴锅:上海精宏实验设备有限公司产品;M5 酶标仪:美国 Molecular Devices 公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 浆料的腐败 取 200 mL 新鲜的浆料于 1 L 已灭菌的蓝盖瓶中,于 37 °C 的培养箱中放置 12 h,使其充分腐败。

1.3.2 菌落总数的测定 菌落总数测定参考 GB 4789.2-2010:浆料以 10⁻¹ 的梯度进行稀释,选择其中 3 个合适的稀释度,吸取各梯度稀释液 1 mL 于平板中,采用倾注法注入营养琼脂培养基,摇匀,经 37 °C 条件培养 48 h 后计数,每个稀释度进行 3 次重复^[6]。

1.3.3 腐败菌的分离纯化 将上述平板上的菌落逐一镜检,筛选出菌落形态和镜检形态不同的菌株,然后在培养基上反复进行平板划线分离,得到纯化的单个菌落^[7]。

1.3.4 单菌落 DNA 提取 选用生工生物工程(上海)有限公司的细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取单菌落 DNA。

1.3.5 16S rDNA 的 PCR 扩增 以提取的基因组 DNA 为模板,正向引物为 7f:5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3',反向引物为 1540r:5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。选用 50 μ L 体

系进行聚合酶链式 PCR 反应。PCR 反应条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 35 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃延伸 8 min;12 ℃保存 10 min。DNA 的测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。登陆 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/),将所测得的序列与已知序列进行比对^[8]。

1.3.6 腐败菌的抑制^[9] 将腐败菌分别在 LB 培养基中 37 ℃条件下培养 24 h 活化,采用平板计数法测定菌体浓度,将培养液稀释为含菌体 10⁷ cfu/mL 的菌悬液,4 ℃冰箱暂存备用。

将 5 种防腐剂(山梨酸钾、双乙酸钠、尼泊金酯钠、EDTA-2Na、ε-PL)配制成质量浓度分别为 100、10、1 mg/mL 的溶液,经 121 ℃灭菌 20 min,4 ℃冰箱暂存备用。在含有 8.9 mL 的 LB 培养基的试管中,实验组加入 1 mL 防腐剂溶液,0.1 mL 菌悬液;阳性对照组用无菌水取代防腐剂,阴性对照组用 LB 培养基取代菌液。所有试管中的培养液总体积均为 10 mL,使各防腐剂的终质量浓度分别为 10、1、0.1 mg/mL。取各梯度稀释度及阴、阳性对照组 0.2 mL 注入无菌的 96 孔培养板中,然后于酶标仪 600 nm 下 37 ℃培养 24 h 并测定吸光值。

抑菌率的计算:

$$\text{抑菌率} = \left(1 - \frac{A_{600\text{nm}}(\text{实验组}) - A_{600\text{nm}}(\text{阴性组})}{A_{600\text{nm}}(\text{阳性组}) - A_{600\text{nm}}(\text{阴性组})} \right) \times 100\%$$

最低抑菌质量浓度(MIC)的测定:首先根据防腐剂 3 种质量浓度(10、1、0.1 mg/mL)的抑菌率初步确定其 MIC 的范围,在此范围内设定密集的质量浓度梯度并测定其 600 nm 下的吸光值,样品孔指示菌的 A_{600 nm} 值与阴性对照组无明显差异时的浓度视为最小抑菌浓度。

2 结果与分析

2.1 浆料腐败前后比较

将新鲜浆料放入 37 ℃培养箱 12 h 以后,浆料发生明显的腐败。如表 1 所示,经过培养腐败之后,细菌大量繁殖,菌落总数增加了 3 个数量级。与新鲜浆料相比,腐败浆料的 pH 值有所降低,同时分散在浆料中的纤维漂浮到浆料表面,伴有少量的气泡,说明浆料在腐败过程中,腐败菌有产酸产气现象发生。

表 1 浆料腐败前后 pH 值和菌落总数的变化

Table 1 Changes of pH and total plate count of pulp before and after spoilage

| 浆料 | 菌落总数/(cfu/mL) | pH |
|-----|---------------------|------|
| 未腐败 | 1.9×10 ⁴ | 6.10 |
| 腐败 | 2.3×10 ⁷ | 5.76 |

2.2 浆料中腐败菌的分离与初步确定

根据菌落形态和镜检形态的不同,从营养琼脂培养基上筛选出 4 株主要腐败菌:J₁、J₂、J₃ 和 J₄。根据群体特征、形态特征、革兰氏染色结果和生理生化特征^[10],依据《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版和第九版)对这些腐败菌进行分类鉴定。它们的群体特征如表 2 所示,其中,J₄ 的数量最多,J₂ 和 J₃ 数量相当,而 J₁ 的数量最少,因此可以忽略 J₁ 对腐败的影响。研究表明,烟叶及烟丝样品中的水溶性糖主要是葡萄糖和果糖,此外还有少量的蔗糖和麦芽糖^[11-12]。所以,作者重点研究了腐败菌对这 4 种糖的发酵,实验结果如表 3 所示。从表 3 中可以看出,J₄ 完全不能分解上述四种糖产酸产气,而 J₁ 和 J₂ 对这 4 种糖类可以完全分解,并且产酸产气。值得注意的是,J₃ 虽然只能分解葡萄糖产酸,但由于葡萄糖在烟叶组成中具有较高的含量,所以 J₃ 对浆料的腐败作用不能被忽略。综合浆料的腐败现象,腐败菌的相对数量以及腐败菌对糖类的发酵实验,可以认为浆料的腐败主要是由于 J₂ 和 J₃ 引起的。

表 2 腐败菌的菌落形态和相对数量

Table 1 Colony characteristics and relative number of spoilage bacterias

| 序号 | 菌落直径/mm | 菌落形态 | 相对数量 |
|----------------|---------|----------------------------|------|
| J ₁ | 1~3 | 菌落成圆形,边缘整齐,表面光滑湿润,浅黄色,不透明 | + |
| J ₂ | 1~2 | 菌落边缘不规则,边缘不整齐,表面粗糙,淡黄色,不透明 | +++ |
| J ₃ | 1~3 | 菌落边缘不规则,边缘不整齐,表面粗糙,淡黄色,不透明 | +++ |
| J ₄ | 1~2 | 菌落边缘不规则,圆锯齿形,表面粗糙,乳白色,不透明 | ++++ |

注:+越多说明该种细菌数量越多

表 3 腐败菌的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical properties of spoilage bacteria

| 菌种编号 | J ₁ | J ₂ | J ₃ | J ₄ |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 宽度/ μm | 0.5~0.8 | 0.8~1.0 | 0.7~1.1 | 0.6~1.0 |
| 长度/ μm | 1.0~2.0 | 1.4~1.6 | 1.5~4.0 | 0.6~1.0 |
| 革兰氏反应 | - | - | - | + |
| 产酸 | 葡萄糖 | + | + | + |
| | 果糖 | + | + | - |
| | 蔗糖 | + | + | - |
| | 麦芽糖 | + | + | - |
| 产气 | 葡萄糖 | + | + | - |
| | 果糖 | + | + | - |
| | 蔗糖 | + | + | - |
| | 麦芽糖 | + | + | - |

注: +阳性或能够利用; -阴性或不能够利用

2.3 腐败菌的鉴定

对浆料细菌 16S rDNA 序列测定结果进行比对分析,结果见表 4。一般来讲,在菌种分类等级上,当 2 个分类单位间的 16S rDNA 序列同源性大于 97.5%时,可以认为是属于同一种细菌^[13-14]。从表 4 可以看出,分离得到的腐败菌 J₂ 与不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 的同源性均超过 99%,特别是约氏不动杆菌 (*Acinetobacter johnsonii*), 同源性为 99.9%,所以腐败菌 J₂ 鉴定为约氏不动杆菌。另外,分离得到的腐败菌 J₃ 与假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的同源性同样均超过 99%,特别是恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*), 同源性为 99.7%,所以腐败菌 J₃ 鉴定为恶臭假单胞菌。约氏不动杆菌和恶臭假单胞菌在自然界分布广泛,常存在于污水中。例如,连丽丽等从城内污水中分离得到了约氏不动杆菌^[15],蔡天明等从城市污水处理厂好氧池活性污泥中分离得到了恶臭假单胞菌^[16]。

表 4 细菌 16S rDNA 相似度分析

Table 4 Similarity analysis of 16S rDNA of spoilage bacteria

| 序号 | Locus | 菌株名称 (strain) | 登录号 (Genbank) | 相似度 |
|----------------|------------|---|---------------|-------|
| J ₂ | S001015434 | <i>Acinetobacter johnsonii</i> ; a153 | EU434432 | 0.999 |
| | S000002617 | <i>Acinetobacter</i> sp.; LY1 | AJ007008 | 0.998 |
| | S000842640 | <i>Acinetobacter</i> sp. JN18_V65_E | EF059531 | 0.997 |
| | S000842641 | <i>Acinetobacter</i> sp. JN18_V5_C | EF059532 | 0.997 |
| | S002167027 | <i>Acinetobacter haemolyticus</i> ; MJ1 | GU991530 | 0.996 |
| J ₃ | S000736436 | <i>Pseudomonas</i> sp. D71 | DQ923493 | 0.999 |
| | S001155293 | <i>Pseudomonas</i> sp. k2 | EU855782 | 0.999 |
| | S001239884 | <i>Pseudomonas</i> sp. BCBo5 | EU140959 | 0.999 |
| | S001549478 | <i>Pseudomonas putida</i> ; c142 | FJ950579 | 0.997 |
| | S001549493 | <i>Pseudomonas putida</i> ; c84 | FJ950594 | 0.997 |

2.4 腐败菌的抑制

由表 3 可知,引起上网浆腐败的约氏不动杆菌和恶臭假单胞菌均为革兰氏阴性菌。因此,参考了中华人民共和国食品添加剂使用标准 (GB2760-2011),选取了对革兰氏阴性菌具有较好抑菌性的五种广谱防腐剂(山梨酸钾、双乙酸钠、尼泊金酯钠、EDTA-2Na 和 ϵ -PL),考察了它们对这两种腐败菌的抑菌效果,结果见图 1。由图 1 可知,5 种防腐剂对 2 种腐败菌都有一定的抑菌作用,且抑菌效果随着防腐剂质量浓度的增大而加强。例如,当双乙酸钠的质量浓度为 0.1 mg/mL 时,其对约氏不动杆菌和恶臭假单胞菌的抑菌率分别为 4.4%和 8.9%,

而当质量浓度增加到 1 mg/mL 时,其对约氏不动杆菌和恶臭假单胞菌的抑菌率均达到了 100%。此外,从图 1 还可以看出,同一种防腐剂对不同种细菌具有不同的抑菌效果,当质量浓度为 10 mg/mL 时,山梨酸钾和尼泊金酯钠对约氏不动杆菌的抑菌率均达到了 100%,而对恶臭假单胞菌的抑菌率分别只有 57.2%和 67.2%。总体看来,EDTA-2Na 和 ϵ -PL 的抑菌效果明显优于其它防腐剂,当它们的质量浓度为 0.1 mg/mL 时,对两种腐败菌抑菌率已达到 100%,尼泊金酯钠和双乙酸钠次之,山梨酸钾的抑菌效果最不明显。

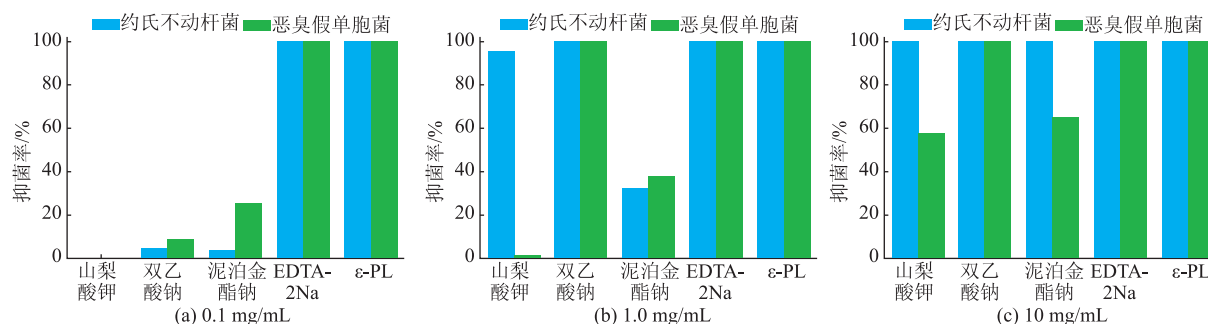


图 1 不同质量浓度的防腐剂对腐败菌的抑菌效果

Fig. 1 Antibacterial activities of food preservatives against two spoilage bacteria at different concentrations

表 5 5 种防腐剂对 2 种腐败菌的 MIC 值 (mg/mL)

Table 5 MICs of five food preservatives against two spoilage bacteria

| 菌种 | 防腐剂种类 | | | | |
|--------|-------|------|-------|----------|-------|
| | 山梨酸钾 | 双乙酸钠 | 尼泊金酯钠 | EDTA-2Na | ε-PL |
| 约氏不动杆菌 | 2 | 4 | 1 | 0.1 | 0.075 |
| 恶臭假单胞菌 | 25 | 12.5 | 1 | 0.075 | 0.05 |

表 5 是 5 种防腐剂对 2 种腐败菌的最小抑菌质量浓度的测定结果, MIC 越低, 说明相应食品防腐剂的抑菌作用越强。从表中可以看到, 对于 2 种菌, 5 种防腐剂的 MIC 值大小的总体排序为: ε-PL < EDTA-2Na < 尼泊金酯钠 < 双乙酸钠 < 山梨酸钾, 表明这 5 种防腐剂中 ε-PL 对这两种腐败菌的抑菌效果最强, 山梨酸钾最弱, 而且 ε-PL 与 EDTA-2Na 对各腐败菌的最小抑菌质量浓度明显低于其它 3 种防腐剂。对于恶臭假单胞菌, 山梨酸钾和双乙酸钠的 MIC 值明显高于约氏不动杆菌, 说明恶臭假单胞

菌对这两种防腐剂具有较强的抗抑制作用; 而 ε-PL 与 EDTA-2Na 的 MIC 值低于约氏不动杆菌, 对恶臭假单胞菌具有很好的抑制作用。

3 结语

从造纸法再造烟叶上网浆中分离出 4 种细菌, 经菌体特征、菌落形态、生理生化实验和 16S rDNA 序列分析, 鉴定出引起上网浆腐败的细菌为其中的约氏不动杆菌和恶臭假单胞菌。此外, 作者还考察了山梨酸钾、双乙酸钠、尼泊金酯钠、EDTA-2Na 和 ε-PL 等 5 种防腐剂对这两种腐败菌的抑菌效果。结果表明, 5 种防腐剂对两种腐败菌都有不同程度的抑菌效果, 防腐剂质量浓度越高其抑菌效果越好, 且同一种防腐剂对不同腐败菌具有不同的抑菌效果。总体来看, 5 种防腐剂的抑菌效果强弱顺序为 ε-PL > EDTA-2Na > 尼泊金酯钠 > 双乙酸钠 > 山梨酸钾, 其中 ε-PL 对约氏不动杆菌和恶臭假单胞菌的 MIC 值分别为 0.075mg/mL 和 0.05 mg/mL。

参考文献:

[1] 方得胜. 造纸法生产烟草薄片工艺探讨[J]. 纸和造纸, 2001(4): 62-63.
FANG Desheng. Discussion on the process of paper making reconstituted tobacco sheet [J]. *Paper & Paper Making*, 2001(4): 62-63. (in Chinese)

[2] 唐兴平, 陈学榕, 戴达松, 等. 烟草废弃物造纸法制烟草薄片[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2007, 36(2): 205-207.
TANG Xingping, CHEN Xuerong, DAI Dasong, et al. Preparation of tobacco slice from tobacco leaf offal by paper making[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition*, 2007, 36(2): 205-207. (in Chinese)

[3] 韩文佳, 赵传山. 造纸法烟草薄片发展现状[J]. 黑龙江造纸, 2008, 35(4): 47-49.
HAN Wenjia, ZHAO Chuanshan. The recent process of reconstituted tobacco by paper process[J]. *Heilongjiang Pulp & Paper*, 2008, 35(4): 47-49. (in Chinese)

[4] 许日鹏, 苏文强, 段继生. 烟草薄片的开发与应用[J]. 上海造纸, 2009, 39(6): 46-49.
XU Ripeng, SU Wenqiang, DUAN Jisheng. Development and application of tobacco sheet [J]. *Shanghai Paper Making*, 2009, 39(6): 46-49. (in Chinese)

- [5] 李东亮. 基于化学成分的烟草质量评价方法研究与应用[D]. 郑州:河南农业大学, 2008.
- [6] 郎涛, 孙香彬, 侯君, 等. 食品微生物检验中菌落总数测定的注意事项[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(3): 111-112.
LANG Tao, SUN Xiangbin, HOU Jun, et al. The notes in the detection of total number of colonies of food microorganism[J]. **Journal of Microbiology**, 2007, 27(3): 111-112. (in Chinese)
- [7] 朱维军, 焦镠, 石明生, 等. 冷却肉中常见腐败细菌的分离与鉴定[J]. 中国农学通报, 2009, 25(18): 99-101.
ZHU Weijun, JIAO Lei, SHI Mingsheng, et al. Isolation and identification of common corrupt bacterium from chilled meat[J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**, 2009, 25(18): 99-101. (in Chinese)
- [8] 王英, 周剑忠, 黄开红, 等. 泡菜中一株植物乳杆菌的分离筛选及鉴定[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 219-221.
WANG Ying, ZHOU Jianzhong, HUANG Kaihong, et al. Isolation and identification of one lactobacillus plantarum strain from pickles[J]. **Jiangsu Journal of Agricultural**, 2010, 26(1): 219-221. (in Chinese)
- [9] 杨晓韬, 李春, 周晓宏. 7种食品防腐剂对肉制品污染微生物的抑菌效果比较研究[J]. 食品科学, 2012, 33(11): 12-16.
YANG Xiaotao, LI Chun, ZHOU Xiaohong. Comparison of antibacterial effects of seven food preservatives on spoilage microorganisms in meat[J]. **Food Science**, 2012, 33(11): 12-16. (in Chinese)
- [10] 王敏, 檀建新, 路玲, 等. 非发酵豆制品主要腐败菌的分离鉴定[J]. 中国酿造, 2006, 25(6): 68-70.
WANG Min, TAN Jianxin, LU Ling, et al. Isolation and identification of the main spoilage microorganisms in non-fermented soybean products[J]. **China Brewing**, 2006, 25(6): 68-70. (in Chinese)
- [11] 杨俊, 刘江生, 蔡继宝, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定烟草中的水溶性糖 [J]. 分析化学, 2006, 33(11): 1596-1598.
YANG Jun, LIU Jiangsheng, CAI Jibao, et al. Analysis of carbohydrates in tobacco extract by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector [J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2006, 33(11): 1596-1598. (in Chinese)
- [12] 周元清, 吴兆录, 史云东, 等. 高效液相色谱法测定烟草料液中的糖[J]. 分析实验室, 2006, 25(9): 71-74.
ZHOU Yuanqing, WU Zhaolu, SHI Yundong, et al. Analysis of sugars in tobacco sauce by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector[J]. **Chinese Journal of Analysis Laboratory**, 2006, 25(9): 71-74. (in Chinese)
- [13] Clayton R A, Sutton G, HINKLE P S, et al. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa [J]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1995, 45(3): 595-599.
- [14] Kolbert C P, Persing D H. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens [J]. **Current Opinion in Microbiology**, 1999, 2(3): 299-305.
- [15] 连丽丽, 姜华, 朱昌雄. 约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)的分离及其聚磷特性的研究 [J]. 辽宁农业科学, 2009(2): 18-21.
LIAN Lili, JIANG Hua, ZHU Changxiong. Study on isolation and screening of *Acinetobacter johnsonii* and characteristics of phosphorus removal[J]. **Liaoning Agricultural Sciences**, 2009(2): 18-21. (in Chinese)
- [16] 蔡天明, 管莉菠, 崔中利, 等. 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) GM6的聚磷特性研究[J]. 土壤学报, 2006, 43(1): 117-123.
CAI Tianming, GUAN Libo, CUI Zhongli, et al. Study on the accumulating phosphate characteristic of *Pseudomonas putida* GM6 [J]. **Acta Pedologica Sinica**, 2006, 43(1): 117-123. (in Chinese)