

文章编号:1673-1689(2011)06-0956-06

一株转化茴脑生成茴香醛的菌株筛选与鉴定

梁肖仍^{1,2,3}, 宋张杨^{1,2,3}, 曾华贺^{1,2,3}, 申佩弘^{1,2,3},
蒋承建^{1,2,3}, 张敏^{1,2,3}, 武波^{*2,3,4}

(1. 广西大学 生命科学与技术学院, 广西 南宁 530005; 2. 微生物及植物遗传工程教育部重点实验室, 广西 南宁 530005; 3. 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西 南宁 530005; 4. 广西民族大学 化学与生态工程学院, 广西 南宁 530007)

摘要:以反式茴脑为惟一碳源,通过富集培养和分离纯化,从环境中筛选到320株能以反式茴脑作为惟一碳源的菌株。经薄层层析法、紫外分光光度法和气相色谱法相结合对转化液进行分析,结果获得一株相对高产茴香醛的细菌菌株WGB30。该菌最适生长温度28℃,最适pH 6.5,在复筛培养基中,30℃摇床200 r/min培养12 h可达到对数期,在培养60 h时茴香醛的摩尔转化率达5.08%。综合形态学、生理生化实验、Biolog EcoPlates 鉴定和16SrDNA序列分析结果,将菌株WGB30鉴定为伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp.)。

关键词:反式茴脑;茴香醛;伯克霍尔德氏菌;筛选;鉴定

中图分类号:TQ 920.1

文献标识码:A

Isolation and Characterization a Strain for Bioconversion Anethole to Anisaldehyde

LIANG Xiao-reng^{1,2,3}, SONG Zhang-yang^{1,2,3}, ZENG Hua-he^{1,2,3}, SHEN Pei-hong^{1,2,3},
JIANG Cheng-jian^{1,2,3}, ZHANG Min^{1,2,3}, WU Bo^{*2,3,4}

(1. College of life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. Key laboratory of Microbial and Plant Genetic Engineering of Ministry of Education, Nanning 530005, China; 3. Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization of Guangxi, Nanning 530005, China; 4. College of Chemistry and Ecological Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530007, China)

Abstract: Using trans-anethole as the sole carbon source, a strain WGB30 was screened from 320 isolates, and 50 environmental samples by thin-layer chromatography, high efficiency liquid chromatography and spectrophotometry. It was found that the optimum temperature and pH is 28℃ and 6.5 for this strain, respectively. One loopful of the plate culture was inoculated into 100 mL medium containing 0.5% anethole as carbon source incubated at 30℃ for 60 h with reciprocal shaking (200 strokes/min), the ratio conversion of anisaldehyde is up to 5.08%. According to the morphological features, the results of physiological and biochemical experiments and 16S rDNA sequence analysis, this strain was identified as *Burkholderia* sp.

Key words: trans-anethole, anisaldehyde, *Burkholderia* sp, isolation, identification

收稿日期:2010-11-26

* 通信作者: 武波(1962—),男,广西武宜人,理学博士,教授,博士研究生导师,主要从事农业微生物学和环境微生物学方面的研究。Email:wubogxu@gxu.edu.cn

茴香醛(*p*-Anisaldehyde)又称大茴香醛,化学名为对甲氧基苯甲醛,它具有持久的山楂香气,芬芳诱人,同时具有较强的抗氧化性能,广泛用于食品、香料、制药及电镀等许多工业中^[1]。如用于食品、糖类及饮料类香精的配制^[2-3];制备药物吡啶类光敏剂、血管扩张剂、羟氨卡基青霉素等的中间体^[4-6];作为杀虫剂、生物生长抑制剂等。目前茴香醛产品大部分采用化学法合成,化学工艺存在原料不足、分离困难和污染严重等问题。近几年新开发的电氧化工艺^[7]和臭氧化工艺^[8],虽然在环境污染等问题上得到了重大改善,但反应条件比较苛刻、设备要求高,工业化困难。因此,寻求经济有效的茴香醛生产途径是一个值得研究的课题。

八角茴香油(*star anise oil*)又称大茴香油或茴油,是将植物八角的果实或枝叶用蒸馏方法得到的精油,其反式茴脑体积分数为80%~90%^[9]。八角和八角茴油作为广西盛产的天然香料资源,年出口产量约占世界产量的80%,但深加工产业以及产品较少,每年主要以原料形式或茴香油等初加工产品大量出口;茴香脑的加工利用仍处在较原始阶段。利用茴油中的反式茴脑可氧化制得茴香醛、茴香酸、茴香醇及其衍生物等具有更高附加值的香料和医药中间体^[5,10]。

目前关于茴脑的生物降解和转化的文献报道不多,Shimoni E等^[11-12]从土壤中分离到一株能以反式茴脑为惟一碳源的细菌菌株TA13,经鉴定为节杆菌属(*Arthrobacter* sp.),其反式茴脑的阻断突变株能以反式茴脑、茴香醇和茴香醛作为碳源可高产茴香酸。Ryu等^[13]在*Pseudomonas putida* JYR-1代谢茴香脑的反应液中检测到了茴香脑环氧化合物、茴香酸和对羟基苯甲酸。栗桂娇等^[14-15]开展了反式茴脑生物降解菌株的筛选工作,获得一株为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)的细菌菌株BT-13,同时考察了菌株BT-13在有机溶剂-水两相系统中生物转化的过程,经发酵条件优化,茴香醛的摩尔转化率可达7.7%,还考察了固定化细胞在两相系统中的转化结果,茴香醛的摩尔转化率有所提高,达12.6%。作者以广西盛产的八角茴香油为原料,进行微生物转化茴脑生成茴香醛的菌株筛选和目标产物定性定量的基础研究工作。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 采样 从广西高峰林场八角种植区、广西大学校园菜市场下水道、桂树、阴香和樟树等地采

集土壤、树皮、树枝和八角果实共50份样品,每份约20 g,装入保鲜袋,贴上标签,写明采样时间及地点,保存于4℃冰箱备用。

1.1.2 培养基 富集培养基:一级为改良M9培养基^[12]+体积分数0.2%茴脑;二级为改良M9培养基+体积分数0.3%茴脑;三级为改良M9培养基+体积分数0.4%茴脑。装液量为100 mL/250 mL三角瓶,121℃灭菌20 min。

初筛培养基:改良M9培养基+体积分数0.6%茴脑。121℃灭菌20 min。复筛培养基(1 000 mL):葡萄糖20 g,蛋白胨10 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1 g, NaCl 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $FeSO_4$ 0.01 g,酵母膏2.5 g,体积分数0.5%茴脑。115℃灭菌15 min。固体培养基:在上述液体培养基中添加1.2 g/dL的琼脂粉。

1.1.3 主要仪器及药品 Lambda 25紫外分光光度计;PerkinElmer;UV-100型手提紫外灯;北京爱着华美生物科技有限公司;SP-6890型气相色谱仪;山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司;摇床:美国New Brunswick Scientific Innova系列;超净工作台:苏净集团安泰公司;立式压力蒸汽灭菌锅:上海华线医用核子仪器有限公司;PCR扩增仪:东胜创新生物科技有限公司。

中土茴脑(质量分数99.35%),标准样品茴香醛(质量分数98%),茴香酸(质量分数99%);均为比利时ACROS试剂;薄层层析硅胶板GF₂₅₄;青岛海洋化工有限公司;乙酸乙酯:分析纯,广东光华化学厂有限公司;苯甲酸乙酯:分析纯,成都市科龙化工试剂厂;其余药品均为分析纯或化学纯。

1.2 实验步骤

1.2.1 富集培养及分离纯化 每份样品称取10 g加入已灭菌的富集培养基中,30℃摇床200 r/min培养3 d。经3次梯度富集培养后,将菌液稀释成 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} ,涂布于初筛培养基平板上,30℃培养箱培养5~7 d,挑取平板上的单菌落进行划线分离,纯化后保存于-80℃冰箱。

1.2.2 初筛

1)紫外分光光度法:通过特征吸收波长强度的改变检测底物降解和产物生成的情况。

2)薄层层析法:经纯化后的菌株接入装有初筛培养基的指形瓶,30℃摇床200 r/min培养48 h,加入等体积的乙酸乙酯萃取,充分摇匀后在8 000 r/min下离心5 min,取上相点样于硅胶板GF₂₅₄,检测是否有茴香醛或茴香酸的斑点出现。

1.2.3 复筛 将初筛得到的菌株接入装有复筛培

培养基的三角瓶, 30℃摇床 180 r/min 培养 24 h, 加入底物体积分数 0.5% 茴脑, 转化 3 d, 加入等体积的乙酸乙酯萃取, 取上相, 用气相色谱法检测茴脑的降解率及茴香醛的摩尔生成率。

茴脑的摩尔降解率 = (初始茴脑的摩尔数 - 残余茴脑的摩尔数 / 初始茴脑的摩尔数) × 100%

茴香醛的摩尔生成率 = (生成茴香醛的摩尔数 / 初始茴脑的摩尔数) × 100%

1.3 检测方法

1.3.1 紫外分光光度法 由于底物反式茴脑, 产物茴香醛和茴香酸都具有苯环结构, 在紫外光波段有吸收, 在波长介于 200~400 nm 的紫外光范围内进行扫描, 检测吸收光谱, 通过谱带位置和吸收强度的改变检测底物降解和产物生成, 对转化液进行快速粗定量, 见图 1。反式茴脑、茴香醛和茴香酸的特征吸收波长分别是 258、284、247 nm。

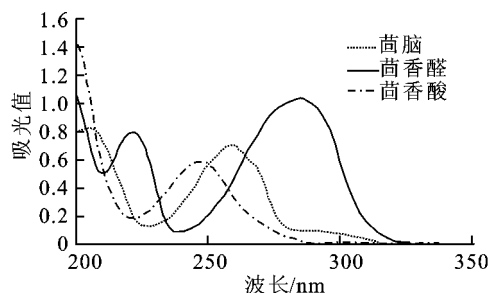


图 1 茴脑、茴香醛和茴香酸的紫外吸收图谱

Fig. 1 UV absorption spectra of anethole, anisaldehyde and anisic acid

1.3.2 薄层层析法(TLC) 转化液用等体积的乙酸乙酯萃取后, 可用薄层层析快速检测转化结果。薄层层析在 GF₂₅₄ 硅胶板上进行, 展层剂为 $V_{\text{石油醚}} : V_{\text{氯仿}} : V_{\text{乙酸乙酯}} : V_{\text{甲酸}} = 25 : 10 : 3 : 0.2$ [14]。层析结果在 254 nm 紫外光下观察, 样品处无荧光, 为紫黑色。

1.3.3 气相色谱法 检测条件为载气 N₂, 尾吹 60 mL/min, 进样口温度 250℃, 检测器温度 300℃。程序升温为柱室初温 100℃维持 2 min, 升温速度 10℃/min, 终温 220℃保持 1min。内标法定量, 内标物为苯甲酸乙酯。

1.4 菌株的鉴定

1.4.1 形态特征观察及部分生理生化实验 形态学和部分生理生化实验参照常见细菌系统鉴定手册 [16]。

1.4.2 Biolog 鉴定 菌株在 Biolog 专用培养基 (BUG) 上培养 24~48 h, 制备菌悬液上样于 GEN III 96 孔微鉴定板, 30℃培养箱培养, 分别在 24 h 和 36 h 使用美国 Biolog 公司的 Biolog 微生物鉴定

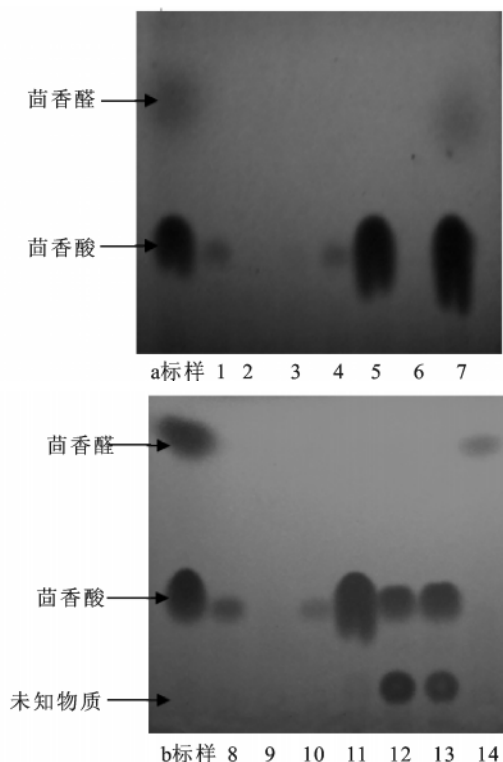
仪读取数据, 将菌株对 95 种碳源的利用情况与数据库中的信息进行比对, 得出鉴定结果。

1.4.3 16SrDNA 鉴定 提取目的菌株基因组 DNA, 利用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGT-TACGACT-T-3') 进行 16S rDNA PCR 扩增, 得到的 PCR 产物送上海生物工程公司测序, 并用 NCBI 中的 BLAST 软件进行序列分析。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选

2.1.1 富集培养和初筛 通过富集培养及分离纯化, 一共获得 320 株能以反式茴脑作为惟一碳源的菌株, 每株菌经过特征吸收峰检测底物降解和产物生成情况, 将产物特征吸收峰值较高的菌株留下, 经过初步筛选, 得到 52 株相对产茴香醛或茴香酸较高的菌株。通过薄层层析法对初筛得到的 52 株菌进行目标产物验证, 检测是否有茴香醛或茴香酸的斑点出现及斑点的大小和颜色的深浅, 从而快速对转化液进行定性和半定量分析, 结果见图 2。



1~7: 菌株 WGB24~WGB30 的转化液; 8~14: 菌株 WGP1~WGP7 的转化液

图 2 部分菌株转化液的 TLC 图谱

Fig. 2 TLC analysis of some strains' inocula extraction liquid

由图 2 可知, 菌株 WGB30 和 WGP7 能产茴香醛; 菌株 WGB28、WGB30 和 WGP4 高产茴香酸, 斑

点大且颜色深;菌株 WGP5 和 WGP6 除了产茴香酸外,还有未知物质。因此,对能产茴香醛和相对高产茴香酸的菌株进行进一步筛选。

2.1.2 复筛 采用气相色谱法,检测菌株 WGB28、WGB30、WGP4、WGP5、WGP6 和 WGP7 转化液中茴脑的摩尔降解率及茴香醛的摩尔生成率,每菌株做 3 个平行,取其平均值,具体见表 1。

表 1 菌株复筛结果

Tab. 1 Results of secondary bacterial strain screening

菌株	茴香醛的 摩尔转化率/%	茴脑的 摩尔降解率/%
WGB28	0.66	21.39
WGB30	5.08	30.30
WGP4	2.06	38.51
WGP5	1.87	45.44
WGP6	0.45	25.88
WGP7	2.88	39.73

复筛的结果进一步表明,菌株 WGB30 是相对高产茴香醛的菌株,其摩尔转化率为 5.08%,茴脑的降解率为 30.3%。因此,以 WGB30 为目的菌株,添加体积分数 0.5%反式茴脑进行生物转化,跟踪转化不同时间茴脑、茴香醛和茴香酸的质量浓度变化,结果见图 3。

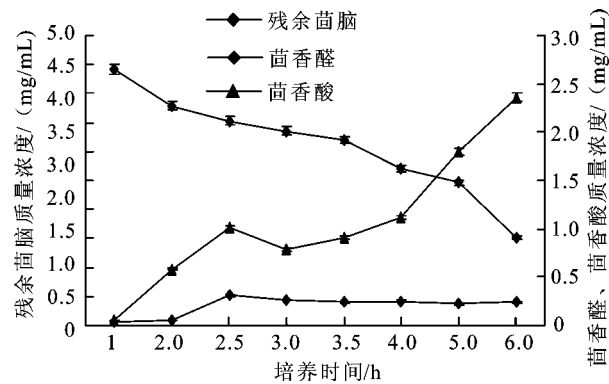


图 3 菌株 WGB30 在不同发酵时间茴脑、茴香醛和茴香酸的质量浓度变化

Fig. 3 Concentration of anethole, anisaldehyde and anisic acid in fermentation of WGB30

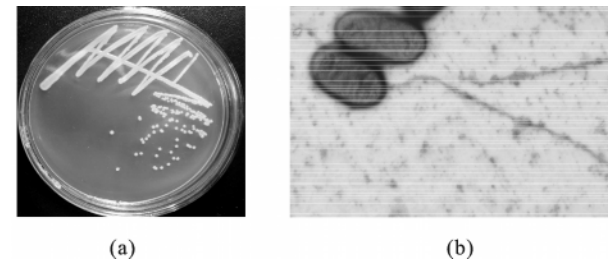
结果表明,随着菌体的迅速增长和转化时间的延长,反式茴脑转化生成茴香醛及茴香酸的量也迅速增多,但茴香醛的产量在转化 60 h 后基本趋于稳定。可能原因是:一是随着底物反式茴脑的减少,菌体量的增多,茴香醛可作为碳源被菌体利用以满足其生理代谢需求;二是茴香醛对细胞有毒害作用,在内环境中的质量浓度过高会抑制菌体的生长,因此迫使其进一步氧化成毒性较小的茴香酸,

从而使茴香酸的量不断增加。

2.2 实验菌株 WGB30 的鉴定

2.2.1 形态学观察、生理生化实验和 Biolog 鉴定

根据菌落形态特征,对 WGB30 的单菌落进行观察。菌落为白色,圆形,边缘整齐,不透明,表面光滑湿润,隆起。革兰氏染色后,显微镜下为革兰氏阴性、杆状菌。电镜下对菌体单细胞观察为短杆状,有单极生鞭毛,无内生芽孢,见图 4。



a: WGB30 在复筛培养基中的菌落形态; b: WGB30 在透射电镜(×7700)下的细胞形态

图 4 WGB30 形态

Fig. 4 Morphology of strain WGB30

参照常见细菌系统鉴定手册,对 WGB30 进行生理生化鉴定,结果见表 2。

表 2 WGB30 菌株生理生化鉴定结果

Tab. 2 Physiology characteristics of strain WGB30

特征	<i>Burkholderia tropicalis</i> sp.	WGB30
生长温度	29~42 ℃	25~41 ℃
最适生长温度	30 ℃	28 ℃
接触酶	—	+
氧化酶	v	—
明胶液化	+	+
脲酶	+	+
Tween 80		+
V-P 试验		—
MR 试验		—
反硝化		—
硝酸盐还原	+	+
pH 值	4.5~7.0	4.5~8.0
最适 pH 值		6.5

注: + 表示阳性; — 表示阴性; v 表示不明显反应。

按照 Biolog 操作说明进行 WGB30 菌株的 Biolog 鉴定,结果表明,该菌株可能为伯克霍尔德里氏菌属(*Burkholderia* sp.) 的一个罕见种或新种。

WGB30 能利用的碳源有: D-海藻糖,蔗糖,蜜三糖、棉籽糖,蜜二糖, D-水杨苷, N-乙酰-D 葡萄糖胺, N-乙酰-D 半乳糖胺, α-D 葡萄糖, D-甘露糖, D-果

糖,D-半乳糖,L-果糖,D-山梨醇,D-甘露醇,D-阿拉伯醇,肌醇和甘油;能利用的氨基酸有:D-天冬氨酸,L-天冬氨酸,D-丝氨酸,L-丝氨酸,L-焦谷氨酸,L-组胺,L-丙氨酸,L-精氨酸,L-谷氨酸和氨基乙酰-L-脯氨酸;抗生素显阳性有:梭链孢酸,利福霉素,醋竹桃霉素,林肯霉素、洁霉素,二甲胺四环素,万古霉素,萘啶酮酸和氨曲南。

实验结果表明,WGB30 菌株的形态培养特征及生理生化特性与伯克霍尔德氏菌属基本一致。

2.2.2 16S rDNA 的鉴定 经上海生工测序,得到实验菌株 WGB30 的 16SrDNA 序列,登陆号为

HQ660946,将该序列用 NCBI Blast 软件与 GenBank 中已报道的序列进行同源性比对,发现该序列与登录号为 gb|AF164045.2| *Burkholderia tropicalis* strain AB98 16SrDNA 的同源性达 99%。

为了进一步考察实验菌株与已知菌株的亲缘关系及其分类地位,根据同源序列搜索结果,下载相关菌种的 16S rDNA 序列,与实验菌株一起用 MEGA 4.0 软件中的 Neighbor-joining 分析法构建系统进化树,结果见图 5。结果表明,菌株 WGB30 与 *B. tropicalis* 进化距离最短、亲缘关系最接近,与 Blast 比对的结果一致。

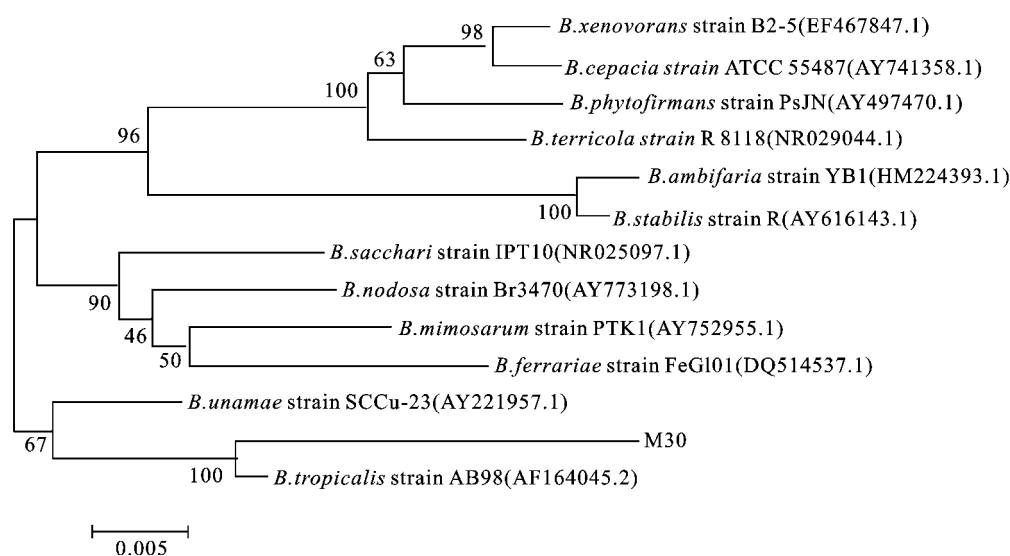


图 5 WGB30 基于 16SrDNA 构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree inferred from 16S rDNA of WGB30

综合实验菌株 WGB30 的形态学、生理生化实验、Biolog 鉴定和 16SrDNA 比对分析结果,将其鉴定为伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia* sp.)。

3 结 语

生物发酵法制备茴香醛是一种新兴的技术,以反式茴脑等芳香烃化合物作为惟一碳源进行筛选高产茴香醛的菌株,是一种较为快捷的方式,但芳香烃化合物都是有毒物质,要得到高产茴香醛的菌株,关键是看菌株的活力和抗毒性能力。

作者从多种样品中筛选到 320 株能以反式茴脑作为惟一碳源的菌株,经多种筛选方法相结合,结果获得一株相对高产茴香醛的菌株 WGB30,其摩尔转化率为 5.08%。WGB30 细胞呈短杆状,有单极生鞭毛,无内生芽孢,革兰氏染色阴性,其 16S

rDNA 序列(登录号 HQ660946)与 *Burkholderia tropicalis* strain AB98 16SrDNA (登录号 AF164045.2)的同源性最高,达 99%。结合形态学和生理生化特征及 BIOLOG EcoPlates 鉴定结果,将其鉴定为伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia* sp.)。

原始菌株 WGB30,添加体积分数 0.5% 茴脑转化 60 h 后,茴香醛的摩尔转化率可达 5.08%,与国内粟桂娇等^[14-15]筛到的原始菌株 BT-13 相比,积累茴香醛的能力有很大优势,与其经条件优化后合成茴香醛的能力相比仍有一定的差距,但可以通过对菌株 WGB30 进行菌种改良、生物转化条件优化及固定细胞技术等手段,使茴香醛的积累量进一步提高,相关工作正在进行之中。

参考文献(References):

- [1] 刘树文. 合成香料技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000:217.
- [2] 林莉. 对甲氧基苯甲醛[J]. 精细与专用化学品,2000,(12):33-34.
LIN Li. Para-methoxybenzaldehyde[J]. *Fine and Specialty Chemicals*,2000,(12):33-34. (in Chinese)
- [3] 蔡军,聂勤. 大茴香醛的合成研究[J]. 香料香精化妆品,2005,(2):21-22.
CAI Jun,NEI Qin. Study on synthesis of anisaldehyde[J]. *Flavour Fragrance Cosmetics*, 2005,(2):21-22. (in Chinese)
- [4] 黄建梅,王嘉林,许文蔚. 中国八角属三种果实挥发油的气相色谱-质谱分析[J]. 中草药,1994,25(10):551.
HUANG Jian-mei,WANG Jia-lin,XU Wen-wei. GC-MS analysis of essential oil from the three fruits of star anise in china [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*,1994,25(10):551. (in Chinese)
- [5] 何春茂. 茴脑的性质及生产、利用[J]. 林产化工通讯,2004,38(1):31-33.
HE Chun-mao. Properties,production and uses of anethole[J]. *Journal of Chemical Industry of Forest Products(Bimonthly)*,2004,38(1):31-33. (in Chinese)
- [6] 杨本勇,杨德宏,张光业. 茴香醛的合成工艺[J]. 中原工学院学报,2005,16(2):16-19.
YANG Ben-yong,YANG De-hong,ZHANG Guang-ye. Study of the synthesis of anisaldehyde[J]. *Journal of Zhengzhou Institute Technology*,2005,16(2):16-19. (in Chinese)
- [7] 李则林,张永康,成阶平. 茴香脑电氧化合成茴香醛[J]. 精细化工,1995,12(11):16-18.
LI Ze-lin,ZHANG Yong-kang,CHENG Jie-ping. Synthesis of anisaldehyde from the electrooxidation of anethole[J]. *Fine Chemicals*,1995,12(11):16-18. (in Chinese)
- [8] 易封萍,周永红,李伟光,等. 臭氧化法制取苯甲醛和茴香醛的研究[J]. 广西大学学报,1998,23(1):54-56.
YI Feng-ping,ZHOU Yong-hong,LI Wei-guang,et al. Study on benzaldehyde and anisaldehyde prepared by ozonization [J]. *Journal of Guangxi University*,1998,23(1):54-56. (in Chinese)
- [9] 李祖光,许丹倩,徐振元. 八角茴香挥发性风味成分的研究[J]. 中国调味品,2003,10:13-15,20.
LI Zu-guang,XU Dan-qing,XU Zhen-yuan. Study on the aroma compounds released from star anise fruits [J]. *Chinese Condiment*,2003,10:13-15,20. (in Chinese)
- [10] 孙宝国,何坚. 香料化学与工艺学[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [11] Shimoni E,Ravid U,Baasov T,et al. The trans-anethole degradation pathway in an *Arthrobacter* sp. [J]. *Journal of Biological Chemistry*,2002,277(14):11866-11872.
- [12] Shimoni E,Baasov T,Ravid U,et al. Biotransformations of propenylbenzenes by an *Arthrobacter* sp. and its t-anethole blocked mutants[J]. *Journal of Biotechnology*,2003,05:61-70.
- [13] Jiyoung Ryu,Jiyoung Seo,Youngshim Lee,et al. Identification of syn-andanti-anethole-2,3-epoxides in the metabolism of transanethole by the newly isolated bacterium *Pseudomonas putida* JYR-1[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2005,53(15):5954-5958.
- [14] 粟桂娇,刘雄民,朱萍,等. 反式茴脑生物降解菌株的筛选及其生物转化[J]. 化工进展,2009,28(1):141-144,172.
SU Gui-jiao,LIU Xiong-min,ZHU Ping,et al. Isolation of trans-anethole degrading bacterial strains and biotransformation of trans-anethole[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2009,28(1):141-144,172. (in Chinese)
- [15] 粟桂娇,刘雄民,李伟光,等. 两相系统中生物转化茴脑生成茴香醛[J]. 精细化工,2009,26(2):136-141.
SU Gui-jiao,LIU Xiong-min,LI Wei-guang,et al. Biotransformation of anethole to anisaldehyde in aqueous-organic solvents biphasic systems[J]. *Fine Chemicals*,2009,26(2):136-141. (in Chinese)
- [16] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:171.