

新疆不同地域发酵乳品中 *Lactobacillus* 多样性的研究

倪亚雯, 兰国伟, 杨尚娇, 倪永清

(石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000)

摘要: 利用 MRS, M17 等 5 种不同培养基从 12 份采自新疆北部伊犁、博乐、塔城、阿勒泰地区牧民家庭传统方法制作的乳品中分离乳酸菌, 并进行了生理生化表型特征鉴定。对这些乳酸菌进行 16S rRNA 基因序列的测序, 构建系统发育树, 初步建立其属水平的进化地位, 再利用乳杆菌种间特异性引物对其进行种水平的鉴定和分类。共分离 164 株疑似乳酸菌, 大部分菌株对温度适应性较强。以杆菌为主, 系统发育表明: 样品中乳酸菌主要有 7 个属, 其中 *Lactobacillus* (78 株)、*Carnobacterium* (3 株)、*Weissella* (1 株)、*Lactococcus* (22 株)、*Enterococcus* (47 株)、*Streptococcus* (8 株)、*Vagococcus* (5 株)。种特性扩增显示乳杆菌存在种水平的差异。主要有 4 个种。利用牛津杯从样品中筛选出了 10 株对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*) 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 均具有明显抑制作用的乳杆菌, 为乳酸菌作为生物型防腐剂应用到食品工业中奠定基础。

关键词: 乳杆菌; 多样性; 系统发育; PCR

文章编号: 1673-9078(2016)6-104-109

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.017

Diversity of *Lactobacillus* Isolates in Fermented Dairy Products from Different Regions of Xinjiang

NI Ya-wen, LAN Guo-wei, YANG Shang-jiao, NI Yong-qing

(College of Food, Shehezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: MRS, M17, and three other culture media were used to isolate lactic acid bacteria (LAB) from 12 samples of naturally fermented dairy products collected from the herdsman families in the northern areas (Yili, Bole, and Tacheng) of Xinjiang, and the physiological and biochemical phenotypes were characterized. The LAB isolates were analyzed by 16S rRNA sequencing to construct phylogenetic trees and initially establish their evolutionary position at the genus level. Subsequently, the identification and classification of LAB at the genus level were conducted using species-specific primers for LAB. One hundred and sixty strains of suspected LAB were isolated from the samples, and most strains showed a broad temperature-adaptability. The majority of strains belonged to the genus *Bacillus*. Based on the phylogenetic tree, the LAB isolated from traditional dairy products belonged to seven genera: *Lactobacillus* (78 strains), *Carnobacterium* (three strains), *Weissella* (one strain), *Lactococcus* (22 strains), *Enterococcus* (47 strains), *Streptococcus* (eight strains), and *Vagococcus* (five strains). Species-specific polymerase chain reaction (PCR) identification showed that *Lactobacillus* isolates mainly belonged to four species. By the Oxford cup method, ten *Lactobacillus* strains were screened, and they showed inhibitory effects on gram-negative *Escherichia coli* and gram-positive strains such as *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. This study lays a foundation for the application of LAB as biopreservatives in the food industry.

Key words: *Lactobacillus*, diversity, phylogeny, polymerase chain reaction (PCR)

收稿日期: 2015-05-20

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(31360001); 新疆生产建设兵团博士资金专项(2011BB009); 新疆生产建设兵团青年科技创新资金专项(2011CB001); 石河子大学自然科学科学重点项目(ZRXX20104001)

作者简介: 倪亚雯(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向食品生物技术方向研究

通讯作者: 倪永清(1969-), 男, 博士, 教授

新疆地域辽阔, 少数民族众多, 哈族蒙古族等牧民们利用牛奶、羊奶、驼奶等为原料制得的具有各自特色的酸奶子、奶皮子、酥油、奶疙瘩、奶豆腐、奶油等作为日常所必须的食品。这类天然发酵乳品及其衍生的加工乳制品含有丰富的乳酸菌种资源, 孕育了极其丰富的乳酸菌资源及遗传多样性, 基于这一现状准确详尽开展乳品微生物组的研究非常必要。其中

Lactobacillus 是乳品工业中广泛存在的乳酸菌, *Lactobacillus* 属作为微量需氧的革兰氏阳性无芽孢杆菌普遍存在于各种类型的环境中。细胞呈杆状, 分为专性同型发酵群(A)、兼性异型发酵群(B)和专性异型发酵群(C)。不能液化明胶, 不分解酪素, 大多数能产生少量的可溶性氮, 不产生吲哚和 H_2S , 无细胞色素。一般生长温度范围在 $2\sim 53\text{ }^\circ\text{C}$, 最适温度是 $30\sim 40\text{ }^\circ\text{C}$ 。其 DNA 中 G+C 含量摩尔分数为 $32\%\sim 53\%$ 。目前对于乳杆菌的研究较为感兴趣的原因主要是: (1) 它与促进人类的健康有密切联系; (2) 它们存在于许多用于改善营养成分或产品质量的食品中; (3) 立法和工业组织的要求, 以及消费者对安全, 标记, 专业和商业应用该的菌株的完整性的要求。清楚它们的特性对于人们日常发酵饮食具有很大的应用潜质。它们大量分布在富含可利用碳水化合物的物质中, 是人和动物肠道内重要的生理性有益菌, 它具有维持胃肠道正常的微生态平衡, 抑制病原菌的入侵和感染, 增强机体免疫力, 预防和抑制胃肠道肿瘤术后菌群失调和细菌移位发生等作用^[1,2]。到目前为止, 我们对新疆地区少数民族经年累月消费的乳制品中微生物群落结构了解极少, 要准确评估以上特色乳品对新疆地区少数民族健康的影响, 开展乳品微生物组的研究将非常必要。

1 材料与方法

1.1 样品采集

从新疆北部伊犁, 博乐, 塔城, 阿勒泰地区牧民家庭广泛取样, 所有样品贴上标签后置于车载冰箱内冷藏, 12 h 之内运回实验室后, 在无菌条件下再次取样。

1.2 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0, $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 15 min。

改良 MRS 培养基: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 10 g, 酵母提取物 5 g, K_2HPO_4 2 g, 柠檬酸二铵 2 g, 乙酸钠 5 g, 葡萄糖 20 g, 吐温 80 1 mL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.588 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.25 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 L, pH 6.2~6.4, $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 15 min。

分离培养基: Elliker 琼脂培养基、M17 培养基、胆汁七叶灵苷叠氮钠培养基和乳酸杆菌选择性培养基。

1.3 菌株的分离和纯化

采用直接稀释样品, 平板涂布法进行分菌, 样品用生理盐水做 10 倍梯度稀释, 取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 四个稀释悬液 200 μL 分别涂布于乳酸菌通用固体平板 MRS, Elliker, M17, 胆汁七叶苷叠氮琼脂, 乳酸杆菌选择性琼脂上。每个梯度涂布 2 个平板, 置于厌氧条件下, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 2 d, 菌株的细胞形态、菌落形态、生理生化试验参照文献^[3,4]进行, 每种培养基挑取 40 个单菌落, 转接划线 3 次后, 通过革兰氏染色和接触酶实验进行初筛, 初步确定疑似乳酸菌。将菌株的液体培养物离心后。加入新鲜培养液^[5,6]重悬, 加入 20% 的灭菌甘油冷冻保藏置 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱。待使用时再次划线活化。

1.4 分离乳酸菌菌株的鉴定和系统发育

采用 CTAB 法提取 DNA, 用移液枪吸取培养至对数期的菌悬液 1 mL, 加入到 1.5 mL 离心管(已灭菌)中, 5000 r/min, 弃上清, 然后加入 500 μL TE 缓冲液清洗沉淀, 置于离心机中离心 1 min 弃去上清液, 进行连续清洗两次。加 200 μL TE 悬浮沉淀, 并加 10 μL 10% SDS, 1 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K, 混匀, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 保温 1 h; 加 30 μL 5 mol/L NaCl, 混匀; 加入 CTAB/NaCl 溶液 30 μL , 混匀, 置于 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 保温 20 min; 加入酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 500 μL 进行抽提, 于 10000 r/10 min, 转移上清液至干净的离心管中; 继续加入酚/氯仿/异戊醇 (24:1) 500 μL 抽提, 重复 3~4 次, 吸取上清液移至干净离心管中; 加 2 倍体积的冷的无水酒精, 颠倒混合, 低温放置 4~6 h, 沉淀 DNA; 10000 r/10 min, 沉淀 DNA, 加入 500 μL 70% 乙醇, 10000 r/10 min, 弃乙醇, 吸干; 重复乙醇洗涤步骤; 待残留乙醇晾干后, 加入 100 μL TE 缓冲液, 取 3 μL 用于琼脂糖凝胶电泳验证, 其余 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。结合生化试验将疑似乳酸菌进行 16S rRNA 扩增并测序。测序使用通用引物 27F/1492R, PCR 扩增条件: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 4 min, $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min, $55\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min (30 个循环), $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。序列结果提交到 GenBank 数据库中, 用 BLAST 进行相关序列比对。比较供试菌株与已知乳酸菌相应序列的同源性。为进一步显示分离的乳酸菌与比对菌的亲缘关系, 将所选的已知菌与待测菌序列一起用 Clustal X1.83 软件进行匹配排列, 用 Mega 5 软件中的 neighbor-joining 分析法构建系统发育树, 并进行 1000 次 Bootstraps 检验^[7]。

1.5 乳杆菌种间特异性 PCR

据现有的研究发现乳杆菌属包含数百种, 然而,

据有限的文献报道显示对乳杆菌的鉴定在菌株水平^[8], 深入了解其分类学意义重大。通过属水平的初步鉴定后将属于 *Lactobacillus* 属的菌株进行种间特异性

PCR 鉴定, 并构建系统发育树。反应引物和条件参见表 1。

表 1 *Lactobacillus* 种水平鉴定所用引物和条件

Table 1 Primers and reaction conditions used for the identification of *Lactobacillus* species

Sain	primers	Length/bp	Reference
<i>Lb.spp</i>	LBLMA1/R16-1	250	Dubernet ^[9]
<i>Lb. acidophilus</i>	AciI/AciII	500	Tilsala and Alatosava ^[10]
<i>Lb. casei</i>	Casei/Y2	290	Ward and Timmins ^[11]
<i>Lb. curvatus</i>	Lc/16	222	Berthier and Ehrlich ^[12]
<i>Lb. fermentum</i>	FERM1/LOWLAC	889	Chagnaud ^[13]
<i>Lb. graminis</i>	16f/Lg	222	Berthier and Ehrlich ^[12]
<i>Lb. paracasei</i>	PARA/Y2	290	Ward and Timmins ^[11]
<i>Lb.paraplantarum/</i>	LOWLAC/PAR1	850	Chagnaud ^[13]
<i>Lb. plantarum</i>	paraF/prev	318	Torriani ^[14]
<i>Lb. pentosus</i>	Lpe/16	205	Berthier and Ehrlich ^[12]
<i>Lb. rhamnosus</i>	Rham/Y2	290	Ward and Timmins ^[12]
<i>Lb.sakei</i>	16f/Ls	222	Berthier and Ehrlich ^[13]

表 2 部分分离自新疆发酵乳品中乳酸菌的生理特性

Table 2 Physiological characteristics of the lactic acid bacteria isolated from fermented dairy products

指标	杆菌			指标	球菌			
	乳杆菌	肉杆菌	魏斯氏菌		乳球菌	肠球菌	链球菌	漫游球菌
硝酸盐还原	-	-	-	硝酸盐还原	-	-	-	-
明胶液化	-	-	-	明胶液化	-	-	-	-
生成吲哚	-	-	-	生成吲哚	-	-	-	-
H ₂ S 产生	-	-	-	H ₂ S 产生	-	-	-	-
10℃生长	+	-	+	6.5%NaCl	+	+	-	+
精氨酸水解	-	-	+	10℃生长	+	+	-	-
M.R	+	+	-	M.R	+	-	+	-
V-P	-	-	-	V-P	-	+	+	-
产氨	+	-	-	产氨	-	+	-	-
果糖	+	+	+	果糖	-	-	+	-
半乳糖	+	+	+	半乳糖	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	葡萄糖	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	麦芽糖	+		+	+
甘露糖	-	-	+	甘露糖	+		+	
海藻糖	-	-	+	海藻糖				
棉子糖	-	+	+	棉子糖	-	+	-	-
阿拉伯糖	-	-	-	阿拉伯糖		-		
鼠李糖	-	-	-	鼠李糖	-	-	-	-
葡萄糖酸盐	+	+	-	葡萄糖酸盐	+	-	+	-
牛奶分解	+	+	-	牛奶分解	-	-	+	-

注: 球菌发酵糖实验较少, 空格为没有进行测定。

1.6 牛津杯法初筛具有抑菌活性的乳酸菌

在直径 7 cm 的培养皿中加入 20 mL LB 固体培养基, 凝固后, 分别吸取 100 μL 指示菌稀释液(活菌数

为 2.0×10^8 CFU/mL)于固体培养基中,用灭菌棉签涂抹均匀,在每个平皿中等距离放置牛津杯4个,每个牛津杯中加入 200 μ L 的乳酸菌上清液,以未加菌株的灭菌空白培养基作为对照,在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中放置扩散 5 h,后于 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。若在牛津杯周围出现抑菌圈,则表明该乳酸菌具有抑菌活性,并用游标卡尺测量抑菌圈直径,每个菌株做三个平行实验,求均值。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌生理生化鉴定结果

从 12 份发酵乳品中共分离鉴定 164 株乳酸菌,包括 104 株杆菌,60 株球菌。其形态观察菌落都为乳白色,圆形,湿润,直径约为 0.5~2 mm。生理生化鉴定如表 2,镜检如图 1。

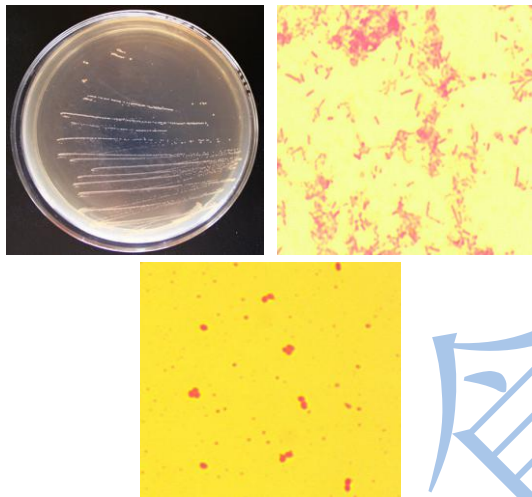


图 1 乳酸菌菌落形态及其细胞形态

Fig.1 Colony and cell morphology of lactic acid bacteria

这些菌株硝酸盐还原、明胶实验、吲哚实验均为阴性,发酵不会产生 H_2S ,都可以利用葡萄糖发酵产酸不产气。除利用葡萄糖,所有分离的杆菌还可以利用果糖、半乳糖、麦芽糖发酵;而球菌发酵的只是半乳糖。杆菌 V-P 实验均为阴性;球菌 V-P 实验有阴性和阳性反应。乳杆菌和肠球菌产氨表现阴性,其余菌株均为阳性。经温度处理发现在 10 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 等不同温度条件下都有不同的生长状态。

2.2 16SrRNA 基因序列分析

将乳品中分离筛选到的乳酸菌菌株的部分 16S rRNA 基因序列提交 NCBI,利用 BLAST 工具在 GenBank 数据库与已知的 16S rRNA 基因序列进行同源性比对,并选取同源性最高的序列构建系统发育树(图 2),结果显示,鉴定的 164 株乳酸菌属于 7 个属,分别属于 *Lactobacillus*、*Carrobacterium*、

Weissella、*Lactococcus*、*Enterococcus*、*Streptococcus*、*Vagococcus*。由系统发育树可知,天然发酵乳样品中分离出的乳酸菌中乳杆菌所占比重最大,且多数与 *Lactobacillus sakei* 和 *Lactobacillus plantarum* 的 16S rRNA 部分基因序列的同源性在 99%;其次是隶属于 *Enterococcus* 属的菌株所占比重也较大,序列相似性达到 98% 以上;通过系统发育树的建立发现没有分离出 *Leuconostoc*、*Pediococcus* 这可能与样品采集的时间,乳品中微生物的群落组成及相互作用等因素相关。由于乳杆菌属包含不同种,对于其分类研究需要深入到种水平。熊素玉^[15]从新疆乌鲁木齐市水西沟牧民家庭自制酸马奶、伊犁地区牧民家庭自制酸马奶、吉尔吉斯斯坦市售酸马奶和哈萨克斯坦市售酸马奶中分离纯化鉴定出 21 株乳酸菌。经试验研究确定乳杆菌属有 17 株,包秋华等人^[16]从我国甘肃省和四川省 6 个县 27 个地区的不同牧民家庭采集牦牛奶及传统发酵牦牛奶制品 152 份,利用 16S rDNA 序列分析等方法,得到 533 株乳酸菌,共 6 个属 24 个不同的种和亚种。其中乳杆菌属占最多,且在微生物的多样性上,瑞士乳杆菌是甘肃地区传统发酵酸牦牛奶、曲拉、乳清中的优势菌,嗜热链球菌和瑞士乳杆菌分别是四川酸牦牛奶和曲拉的优势乳酸菌,这与我们本次样品中分离的菌株所研究结果也有相似之处。

2.3 种间特异性扩增 *Lactobacillus* 序列分析

利用特异性扩增 *Lactobacillus* 进行种水平 PCR 部分结果如图:图 3 利用 *Lb.sakei*、*Lb. curvatus*、*Lb. graminis* 的特异性种引物对其 16S rRNA 同源性在 98% 以上的菌株进行扩增,共选取了 11 株菌,有部分代表菌并未扩增出条带, HFX-B-2、YMX-C-2、TC-M-3、MLT-M-3、ALT-M-2 扩增出条带,与属水平上的鉴定有差异,扩增出的菌株说明系统发育非常接近。又利用 *Lb. plantarum*、*Lb. acidophilus* 对图 4 中的菌株进行种特异性扩增,只有 NLT-C-5、BL-M-1、NLT-E-1、KKTH-M-4 能够特异性扩增出条带。本研究只利用了 5 个种引物对乳杆菌进行分子方法的鉴定分析,理论证明的数据还是不足的,但是与传统可培养方法通过表型理化分析来鉴定乳酸菌相比,前者对于菌株的鉴定存在着误差和局限性,近年来随着分子技术的不断进步和发展,对于乳酸菌分离鉴定水平也有了越来越大的提高。

新疆作为我国最大的畜牧省区之一,许多少数民族群众在此生活,食用自然发酵乳制品作为其传统美食,其中对这些产品中的微生物组成,尤其是占主要组成的珍贵的乳酸菌资源的研究相对较少,大多数都

停留在分离鉴定和发酵糖的水平上,大量的益生优良乳酸菌等待开发和深入。乳酸菌根据自身的这些特殊性质研究更多的应该向其功能性,安全性方面进行探索。本研究对乳酸菌只进行了多样性的分析,对分离的菌株并未进行毒理学及更深入的基因水平的研究,需要在今后进一步的重视。单纯利用形态学鉴定的结果并不准确,还需要结合分子手段进行分析。

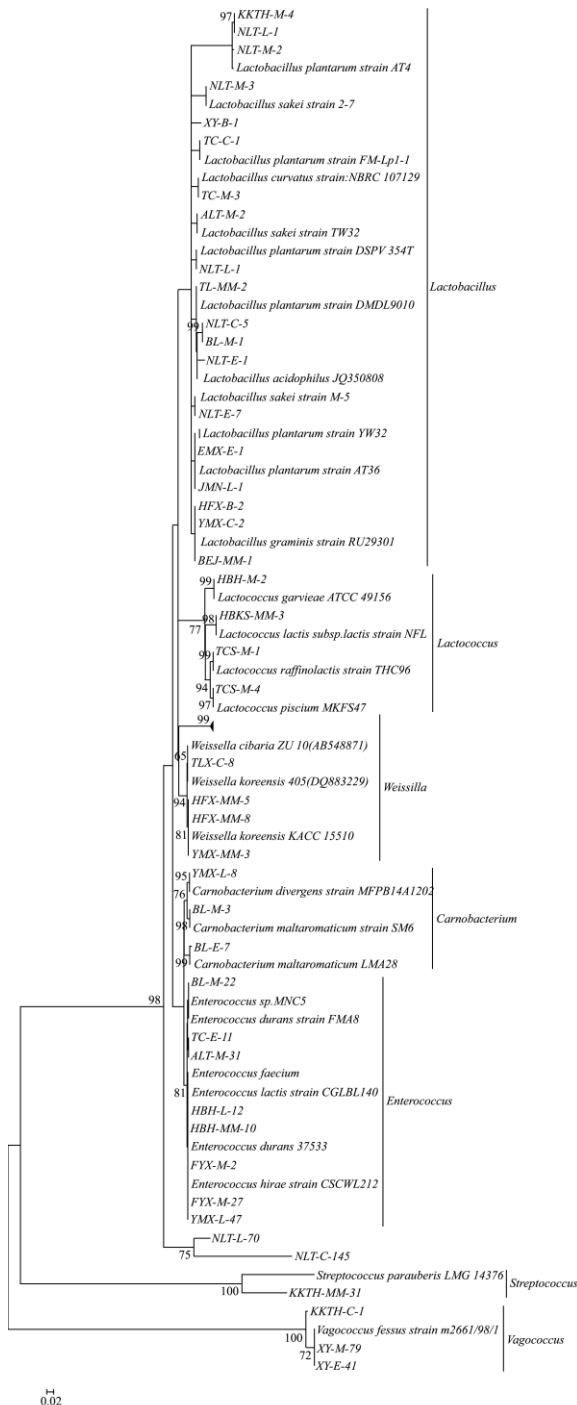


图2 基于16S rDNA 序列的菌株系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of strains based on partial 16S rDNA sequences

2.4 具有抑菌活性乳杆菌抑菌谱

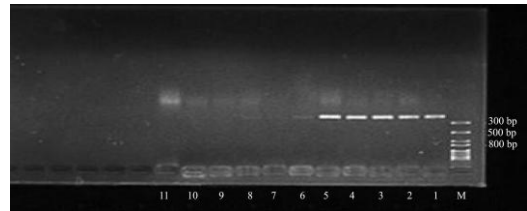


图3 乳杆菌种特异性扩增 (1)

Fig.3 Species-specific amplification of LAB

注: Lanes: 1, HFX-B-2; 2, YMX-C-2; 3, TC-M-3; 4, MLT-M-3; 5, ALT-M-2; 6, YNX-B-5; 7, NLT-E-2; 8, TLX-MM-3; 9, AKQ-C-2; 10, XYX-B-5; 11, ALT-L-1; M, Trans5K DNA Marker.

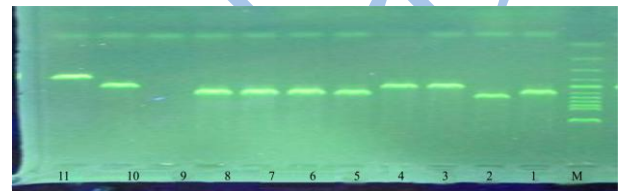


图4 乳杆菌种特异性扩增 (2)

Fig.4 Species-specific amplification of LAB

注: Lanes: 1, TC-E-2; 2, KNS-B-2; 3, NLT-C-5; 4, BL-M-1; 5, GL-B-1; 6, GL-L-5; 7, KKTH-L-22; 8, FYX-L-31; 9, NLT-M-102; 10, NLT-E-1; 11, KKTH-M-4; M, 100bp DNA Ladder.

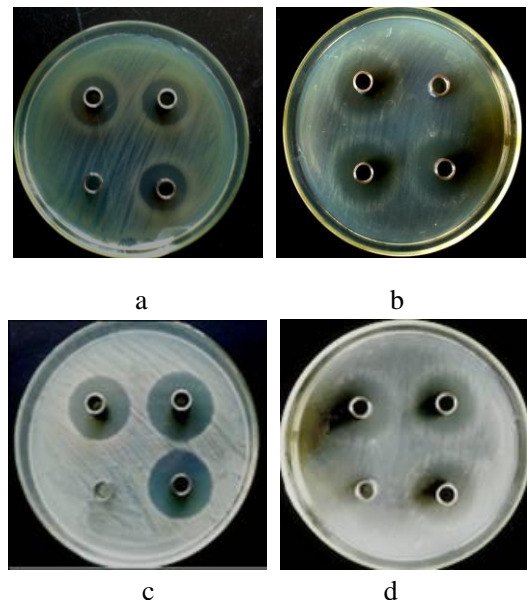


图5 抑菌图

Fig.5 Antibacterial test images

从分离纯化的乳酸菌作为目标菌,分别以四种革兰氏阳性和革兰氏阴性菌作为指示菌筛选具有抑菌活性的菌株。显示有10株菌在不同的程度上都会抑制腐

败菌的生长, 这些菌株包括乳杆菌属、乳球菌属、肠球菌属和魏斯氏菌属。抑菌谱如表: 所产生的抑菌圈在8 mm~20 mm范围内(牛津杯直径为7 mm), 抑菌圈直径如图5, 由抑菌谱表3可见, 不同的指示菌对同一

乳杆菌的抑菌程度不同。a为对金黄色葡萄球菌的抑菌效果, b为对枯草芽孢杆菌的抑菌效果, c为对李斯特氏菌的抑菌效果, d为对大肠杆菌的抑菌效果。

表3 对指示菌的抑菌谱

Table 3 Antibacterial spectrum for indicator bacteria

指示菌	TC-E-2	TFX-M-2	BL-M-22	TLX-C-8	NLT-E-1	TCS-M-1	TCS-M-4	AKQ-L-10	NLT-C-71	XY-B-9	GL-E-6
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	++	+	-	+	+++	+	+++	-	-	++	++
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	+	++	+++	++	+	-	+	++	+	+	+
李斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	+++	+	+++	+	++	+	+	++	+++	+	+++
金黄葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i> CICC21600)	+	+	-	+	+	+	-	+++	-	+++	+

注: +: 直径< 8 mm; ++: 直径9-20 mm; +++: 直径>20 mm;

乳酸菌通常能够抑制与其种属相近的菌株, 所以我们利用3株革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)和1株革兰氏阴性菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为指示菌。筛选出了10株既能抑制革兰氏阳性菌又可抑制革兰氏阴性菌的乳杆菌, 这种具有一定抑菌活性的乳酸菌在食品工业的应用价值更高。

筛选和鉴定[J].食品工业科技,2009,30(5):29-130

DONG Cai-wen, MAO Duo-bin, et al. Screening and identification of lactic acid bacterium producing bacteriocin with broad spectrum [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(5): 129-133

[6] 李悦,孙玉梅,杨红,等.产细菌素乳酸菌的筛选及其发酵特性[J].大连工业大学学报,2008,27(1):19-21

LI Yue, SUN Yu-mei, YANG Hong, et al. Selection and characterization of bacteriocin-producing *Lactobacillus* [J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2008, 27(1): 19-21

[7] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method:A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology Evolution, 1987, 4: 406-425

[8] 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: 114-123

[9] Dubernet Desmaures. A PCR-based method for identification of *lactobacilli* at the genus level [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 214: 271-275

[10] Tilsala-Timisjärvi A, Alatossava T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR [J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 35: 49-56

[11] Ward L J H, Timmins M J. Differentiation of *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction [J]. Letters of

参考文献

[1] Hooper L V, Gordon J I. Commensal host-bacterial relationships in the gut [J]. Science, 2001, 292(5519): 1115-1118

[2] 李理,于宝丹,徐军.乳酸菌对尘螨致敏哮喘小鼠模型的免疫调节作用[J].医学研究生学报,2006,19(6):515-520
LI Li, YU Bao-dan, XU Jun. Immunomodulatory effects of Lactic Acid Bacterial on dustmite sensitized murine model [J]. Journal of Medical Postgraduates, 2006, 19(6): 515-520

[3] 凌代文,东秀珠.乳酸菌细菌分类鉴定及试验方法[J].北京:轻工业出版社,1999
LING Dai-wen, DONG Xiu-zhu. Classification, identification and the test of lactic acid bacteria [J]. Beijing: China Light Industry Press, 1999

[4] 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
DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Manual of common determinative bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 2001

[5] 董彩文,毛多斌,白燕红,等.产广谱细菌素口乳杆菌菌株的

- Applied Microbiology, 1999, 29: 90-92
- [12] Berthier F, Ehrlich S D. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S spacer region [J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 161: 97-106
- [13] Chagnaud P, Machinis K, Coutte L A, et al. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species [J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 44: 139-148
- [14] TORRIANI E FELIS. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* Gene-Derived primers [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 8: 3450-3454
- [15] 熊素玉,姚新奎,谭小海,等.酸马奶中乳酸菌的分离、纯化与鉴定[J].新疆农业科学,2007,44(1):696 -701
- XIONG Su-yu, YAO Xin-kui, TAN Xiao-hai, et al. Biochemical identification of *Lactic Acid Bacteria* in Kumiss [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2007, 44(1): 696 -701
- [16] 包秋华.甘肃和四川省牦牛奶制品中乳酸菌的多样性研究 [D].内蒙古:内蒙古农业大学,2012
- BAO Qiu-hua. Diversity Analysis of *Lactic Acid Bacteria* in yak milk products in gansu and sichuan provinces [D] Inner: Inner Mongolia Agricultural University, 2012