婴儿粪便中乳酸菌的分离鉴定及其对小鼠腹泻的治疗作用

郑明英[1]，周海泳[2]，李适云[3]，胡文锋[3]，刘秉杰[4]，杨益衡[4]，陈永泉[3]
（1. 广东肇庆星湖生物科技股份有限公司，广东肇庆 526060）（2. 生物源生物技术(深圳)有限公司，广东深圳 518055）（3. 华南农业大学食品学院生物工程系应用微生物研究室，广东广州 510642）
（4. 东莞市石龙津威饮料食品有限公司，广东东莞 523320）

摘要：从健康婴儿新鲜粪便中分离纯化出 6 株产酸能力强的革兰氏阳性菌，并对其进行了体外抑菌试验研究。筛选出对致腹泻性大肠杆菌（O78、O88、O149）均具有良好抑制作用的 3 个菌株，经过生理生化试验以及 16S rRNA 分析的鉴定，表明 3 株均为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)。然后，挑选一株对致病性大肠杆菌抑菌性最强的菌株进行小鼠和鸡的攻毒试验，其结果表明该菌株安全无毒，且能适当提高动物的料肉比，起到一定的预防和治疗腹泻的作用。

关键词：腹泻；干酪乳杆菌；抑菌；分离；纯化；生化鉴定
文章篇号：1673-9078(2012)7-758-763

Isolation and Identification of the Lactic Acid Bacteria from Infant Faeces and their Therapeutical Effect on Diarrhea of Mice

ZHENG Ming-ying[1], ZHOU Hai-yong[2], LI Shi-yun[3], HU Wen-feng[3], LIU Bing-jie[4]
YANG Yu-heng[4], CHEN Yong quan[3]
(1.Star Lake Bioscience Co, Inc, Zhao Qing 526060, china) (2.Bioforte Biotechnology Co, Ltd, Shenzhen 518055, China) (3.Research center of application microbiology, College of Food Science, South china Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (4.Dongguan Stone Dragon Jun Wei Food and Drink Co, Ltd, Dongguan 523320, China)

Abstract: Six Gram-positive bacteria with strong acidogenicity were separated and purified from fresh feces of healthy babies, and their bacteriostasis *in vitro* were tested. Three strains with high inhibition effect on *diarrhoeic Escherichia coli* (O78, O88 and O149) were screened. The results of biochemical identification and 16S rRNA comparison analysis showed that all the three screened strains were *Lactobacillus casei*. The challenged test in mice and chickens by one strain with strongest inhibition on pathogenic *E. coli* showed that the strain was safe, nontoxic and appropriately improved the animal feed conversion rate, which can used for prevention and treatment of diarrhea effect.

Key words: diarrhea; *Lactobacillus casei*; bacteriostasis; separation; purification; biochemical identification

禽畜腹泻是畜牧业生产中常见的强传染病之一，对集约化养殖业危害极大。当前，最常用的治疗法是使用抗菌药物，其见效快的特点使抗菌药物倍受推崇，然而由于其易破坏肠道正常菌群、增加感染性、提高细菌耐药性，另外，抗生素的残留还会污染食品、间接危害人类的健康。由此，研究和开发无毒、无副作用和无残留的环保功能性药品，已然成为畜牧业发展的要点。

乳酸菌是畜禽肠道内主要的正常菌群，许多研究证明乳酸菌可以产生多种多肽类抗菌素，这些抗菌素可以抑制沙门氏菌、志贺氏菌、葡萄球菌、变形杆菌、绿脓杆菌和大肠杆菌等的生长，并且对寄生虫和革兰氏阴性菌具有选择性抑制作用，对革兰氏阳性菌则不产生抑制作用[1]。经研究发现，乳酸菌在体内发酵乳糖时，产生大量乳酸、乙酸，pH 值下降，肠内处于酸性环境，不但对致病菌，如志贺氏菌、沙门氏菌、大肠杆菌、伤寒杆菌、葡萄球菌等致病菌有拮抗作用。同时，低 pH 值有利于肠道蠕动，维持正常生理功能，阻止致病菌的增殖。另外，乳酸菌会通过抗菌性的蛋

收稿日期：2012-06-13
资助项目：广东省科技厅省部产学研结合项目（2011B090400221）；广东省教育部产学研结合项目（2009B090300106，2010B09400038）；广东省科技厅农业攻关项目（2010B020412001）
作者简介：郑明英（1965-），男，主要从事发酵工程方面的研究
通讯作者：胡文锋（1964-），男，博士，副教授，主要从事应用微生物学研究

白质或者肽来阻碍有害菌的生成[2]。1998 年 AAFCO 年鉴公布了 43 种可用作益生素的菌种，其中半数以上是乳酸菌(Lactic acid baciteria)[3]。可见乳酸菌在益生菌制剂的研究和生产中扮演着重要的角色。范先超等[4]报道，添加益生素可明显提高仔猪的日增重、降低料肉比、提高经济效益，具有恢复微生态平衡，达到预防疾病的目的，能有效地预防仔猪腹泻。牛饲喂乳酸杆菌制剂后，腹泻发病率可减少 27%~37%[5]。王平等[6]在仔猪初生时即投喂乳酸菌 TPY-211 口服液，结果表明：对防治 7 日龄内仔猪腹泻有明显效果。

本研究旨在从健康婴儿的新鲜粪便中，分离出在体外表现对致腹泻大肠杆菌具有良好抑制作用的乳酸菌。通过动物实验，以处于正常生理状态下的昆明小鼠和鸡为实验动物，通过对胃灌乳酸菌和大肠杆菌，观察其生长状况，验证该菌株对肠道微生物菌系的调节作用。为进一步开发应用于防治猪腹泻性疾病的微生态制剂提供有力的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂

仪器：超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司）；立式压力蒸汽灭菌器（江阴滨江医疗设备有限公司）；生化培养箱（上海博讯实业有限公司医疗设备厂）；电子显微镜（日本奥林巴斯株式会社）；pH 计（梅特勒-托利多仪器有限公司）；电子精密天平（梅特勒-托利多仪器有限公司）；恒温培养振荡器（上海世平实验设备有限公司）；移液枪（艾本德国际贸易有限公司）。

试剂：蛋白酶（TAKARA 公司）；溶菌酶（Sigma 公司）；HiFi Taq 聚合酶（invitrogen 公司）；DNA 纯化回收试剂盒（天根生化科技（北京）有限公司）；DNA Marker（TAKARA 公司）。

1.1.2 样品和试验动物

样品：采自健康婴儿的新鲜粪便。

试验动物：健康且体形相近的雌性 5 周龄昆明小鼠 40 只，种蛋鸡 30 羽。

1.1.3 菌种和培养基

菌种：大肠杆菌 O78、O88 以及 O149 由本试验室保藏，均为致动物腹泻的菌株。

培养基：MRS 培养基（培养增值乳酸菌）；肉汤培养基（培养大肠杆菌）；营养琼脂（抑菌试验）；PY 基础培养基、可溶性淀粉培养基、明胶基础培养基、磷酸葡萄糖肉汤培养基、H_2S 培养基、糖(葡萄糖、D-果糖、乳糖、D-半乳糖、麦芽糖、D-木糖、海藻糖、山梨醇、甘露醇、水杨苷、七叶灵)发酵培养基（菌种鉴定）；EMB 琼脂培养基（鉴定大肠杆菌）。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离纯化

称取 1 g 均质后的新鲜婴儿粪便，至装有玻璃珠的 100 mL 无菌生理盐水中充分摇匀，取 1 mL 稀释液于装有 9 mL 无菌生理盐水的试管中进行稀释，分别吸取稀释度分别为 10^{-5}、10^{-7} 和 10^{-9} 的溶液各 1 mL 于培养皿中，分别倒入含 1.5% $CaCO_3$ 的 MRS 固体培养基，轻轻摇匀，待凝固后置于 37 ℃培养箱恒温培养 48~72 h。挑取光滑、凸圆、边缘完整、颜色呈乳白色以及溶钙圈（或透明圈）较大的菌落于试管中培养 24 h。反复进行分离纯化 2~3 次后，挑取疑似乳酸菌生长特征的菌落进行后续验证试验。

1.2.2 抑菌实验

试验菌株按种量 2% (*V*/*V*)接种于 MRS 液体培养基中，静置培养 18~24 h。同时，将三株大肠杆菌指示菌按种量 2% (*V*/*V*)接种于肉汤培养基中，振荡培养 12 h 后，将 5 mL 三株大肠杆菌培养液分别加入 100 mL 营养琼脂中，充分摇匀后倾注于培养皿。待凝固后，用无菌打孔器打孔，往孔里加入试验菌株培养液 100 μL，37 ℃恒温培养 8 h 后测量抑菌圈直径。

判定标准为：抑菌圈直径 4 mm 判定为不敏感。抑菌圈直径 5~10 mm 判定为低度敏感。抑菌圈直径 11~15 mm 判定为中度敏感。抑菌圈直径大于 15 mm 判定为高度敏感。

1.2.3 菌种的鉴定

1.2.3.1 革兰氏染色镜检观察菌体形态

挑取形态各异的菌落，参照文献[7]进行革兰氏染色，并观察其显微形态。对验证为革兰氏阳性菌进行后续的进一步试验。

1.2.3.2 乳酸发酵

(1) 接种革兰氏阳性菌到 MRS 液体培养基，37 ℃恒温下培养 24 h；

(2) 用移液枪无菌吸取发酵液 10 mL，注入空试管中；

(3) 加入 10% H_2SO_4 1 mL，再加入 2% $KMnO_4$ 约 1 mL，此时乳酸即转化为乙醛；

(4) 每试管分别取 1 条滤纸条，在含氨的硝酸银溶液中浸湿，横搭在试管口上；

(5) 将试管徐徐加热至沸腾，使乙醛挥发，如管口滤纸变黑，即证明有乳酸生成。

上述试验每株菌作 2 个平行试验。

1.2.3.3 生理生化试验

挑取乳酸发酵反应为阳性的菌种至相应的培养基中，进行过氧化氢酶试验、需氧试验、运动性检查、

明胶液化试验、V-P 试验、硫化氢试验、淀粉水解试验、糖醇苷发酵试验（葡萄糖、D-果糖、乳糖、D-半乳糖、麦芽糖、D-木糖、海藻糖、山梨醇、甘露醇、水杨苷、七叶灵）。

1.2.3.4 16S rRNA 的分析和进化树的构建

基因组 DNA 的提取：采用改进的 CTAB 法[8]提取菌株基因组 DNA。 PCR 反应扩增目的片段：由 TAKARA 公司合成：上游引物：5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’；下游引物：5’-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3’[9]，进行 16S rRNA 基因的扩增。16S rRNA 基因片段的纯化回收与测序：使用 DNA 纯化回收试剂盒回收纯化目的片段，由华大基因生物技术有限公司进行测序。利用 BLAST 软件将拼接后的结果与 GenBank 数据库进行序列比对，进行同源性分析，构建进化树。

1.2.4 动物试验

1.2.4.1 测定生长曲线

分别培养三株大肠杆菌和抑菌能效最高的新分离乳酸菌，测定培养液 600 nm 下的 OD 值，以 OD 值为纵坐标，时间为横坐标，绘制生长曲线[10]。从而界定菌株进入对数生长期的时间。

1.2.4.2 配制灌胃液

观察上述灌胃乳酸菌和攻毒致病菌的生长曲线，在菌株从对数期刚进入稳定期时，用平板菌落计数法计算出该时间点的活细菌数，然后用生理盐水将该培养液调节为 10^9 cfu/mL 的浓度。

1.2.4.3 攻毒试验

(1) 小鼠试验

表 1 小鼠攻毒试验分组

Table 1 Groups for the challenged test in mice

组名	试验内容	数量/只	每只灌胃液体积/μL
阴性对照组	只灌入生理盐水	10	200
阳性对照组	只在试验前三天灌入大肠杆菌	10	200
试验 I 组	试验前三天灌入大肠杆菌,后四天灌入乳酸菌	10	200
试验 II 组	试验前四天灌入乳酸菌,后三天灌入大肠杆菌	10	200

实验为期 7 d，按照表 1 设计的方案进行灌胃，灌胃前 2 h 禁食，灌胃后 1 h 正常饲养；每天固定时间灌胃一次；并观察和记录小鼠健康情况、日采食量、体重、死亡时间、死亡数，计算死亡率、成活率、料肉比。粪便取样，利用稀释倒平板法，测定粪便中乳酸菌和大肠杆菌的数量。

(2) 鸡试验

试验分组：试验前预饲期 3 d，实验为期 28 d，开始时测定每组鸡的初始体重，结束时测定终末体重，并以“栏”为单位记录采食量。按照表 2 设计的方案进行灌胃，每天固定时间灌胃一次，并观察和记录鸡只健康情况、日采食量、体重、死亡时间、死亡数，计算死亡率、成活率。

表 2 试验设计

Table 2 Groups for the challenged test in chicken

组名	试验内容	数量/羽	每只使用灌胃液体积/mL
阴性对照组	只灌入生理盐水	10	3
阳性对照组	在试验的第 4 天开始灌入大肠杆菌,直到试验终止	10	3
试验组	在试验的第 4 天开始灌入大肠杆菌和乳酸菌,直到试验终止	10	3

2 结果与分析

2.1 抑菌试验结果

经过反复分离纯化，结合镜检结果，初步分离出四株革兰氏阳性、产酸能力强的疑似乳酸菌株，分别命名为 Lac1、Lac2、Lac3、Lac4、Lac5 和 Lac6（以下简称 L1、L2、L3、L4、L5 和 L6）。将这些菌株与三株大肠杆菌作抑菌试验，其抑菌效果如表 3。

表 3 不同菌株培养液对 3 种大肠杆菌的抑菌圈直径 （mm）

Table 3 Inhibition zone diameters of the lactic acid bacteria to three *E. coli* strains

试验菌株	大肠杆菌(O78)	大肠杆菌(O88)	大肠杆菌(O149)
L1	9.1	10.3	12.4
L2	23.6	24.1	16.8
L3	16.7	18.4	16.2
L4	23.5	22.6	23.9
L5	22.2	20.6	23.7
L6	22.5	23.6	23.7

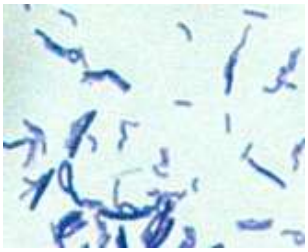
注：表中的抑菌圈直径为 3 次平行试验的平均值表示。

由表 3 可以看出，6 菌株对 3 种不同大肠杆菌均有一定的抑制作用。其中 L4、L5、L6 对大肠杆菌的抑菌效果最好，抑菌圈直径在均>20 mm，其抑菌圈直径由大到小依次为 L4>L6>L5。因此挑选 L4、L5、L6 菌株作进一步的菌种鉴定。

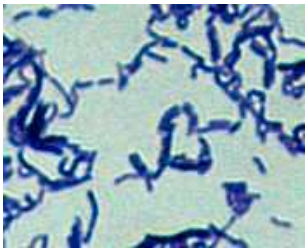
2.2 菌种鉴定结果

2.2.1 镜检

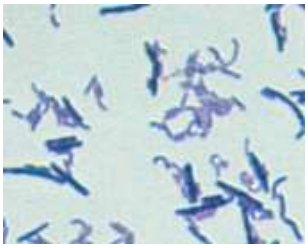
对 L4、L5、L6 菌株进行镜检，其结果如图 1。



L4



L5



L6

图 1 镜检图（L4、L5、L6）

Fig.1 Morphological observation of the lactic acid bacteria

表 4 生理生化鉴定结果

Table 4 Physiological and biochemical identification of the lactic acid bacteria

试验项目	L4	L5	L6
乳酸定性试验	+	+	+
过氧化氢酶试验	-	-	-
明胶液化试验	-	-	-
V-P 试验	-	-	-
硫化氢试验	-	-	-
淀粉水解试验	-	-	-
葡萄糖酵解产酸	+	+	+
葡萄糖酵解产气	+	+	+
麦芽糖酵解产酸	+	+	+
纤维乙糖酵解产酸	+	+	+
果糖酵解产酸	+	+	+
木糖酵解产酸	-	-	-
乳糖酵解产酸	+	+	+
半乳糖酵解产酸	+	+	+
蔗糖酵解产酸	+	+	+
海藻糖酵解产酸	-	-	-
甘露醇酵解产酸	+	+	+
山梨醇酵解产酸	+	+	+
水杨苷酵解产酸	+	-	+
七叶灵酵解产酸	+	+	+

注：阳性用“+”表示，阴性用“-”表示。

观察显微形态，结果显示 L4、L5、L6 的显微形态比较相似：呈杆状，两端圆，无芽孢，无鞭毛，单生或成对或成链出现；菌落形态：菌落白色，凸起，表面光滑，细密，菌落边缘齐整，是乳杆菌的典型特征[11]。

2.2.2 生理生化试验

结合糖醇类发酵试验结果（表 4）、显微形态和菌落特征以及生化试验等结果，对照《伯杰氏细菌鉴定手册（第九版）》[11]和《常见细菌系统鉴定手册》[12]，综合判定：L4、L5、L6 均为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)。

2.2.3 16S rRNA 遗传学鉴定

以 L5 菌株的基因组 DNA 为模板，使用 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增，得到约 1.5 Kb 的特异性扩增产物，测序结果表明：片段长为 1502 bp，将该序列在 GenBank 上应用 BLAST 程序与数据库中已有的同属不同种的乳酸菌 16S rRNA 部分序列进行同源性分析。结果表明，本序列与登录号 CP001084.1、AB531131.1、AB008205.1 等前 26 株干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)的同源性为 100%~99.87%，如图 2。

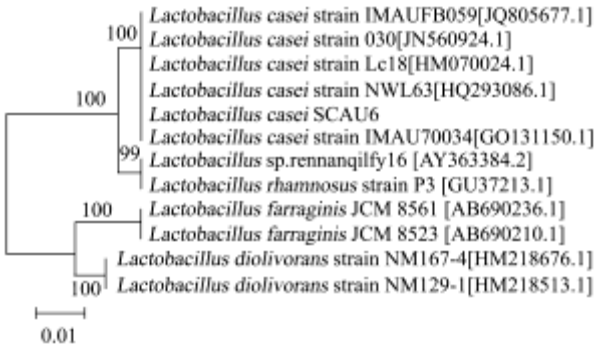


图 2 L5 的进化树图

Fig.2 Genealogical tree of the lactic acid bacterium L5

由形态学、生理生化特征和 16S rRNA 基因比对结果，将 L4 菌株鉴定为干酪乳杆菌，命名为(*Lactobacillus casei* SCAU6)。

2.3 动物试验结果

2.3.1 生长曲线

三株大肠杆菌和抑菌能效最高的新分离乳酸菌的生长曲线图如下：

由图 3 可知，3 种大肠杆菌 O78、O88、O149 分别培养 10 h、10 h、13 h 后进入对数生长期。而新分离纯化的乳酸群则在经过 15 h 的培养后进入了对数生长期。利用这时间点的菌株进行动物试验。

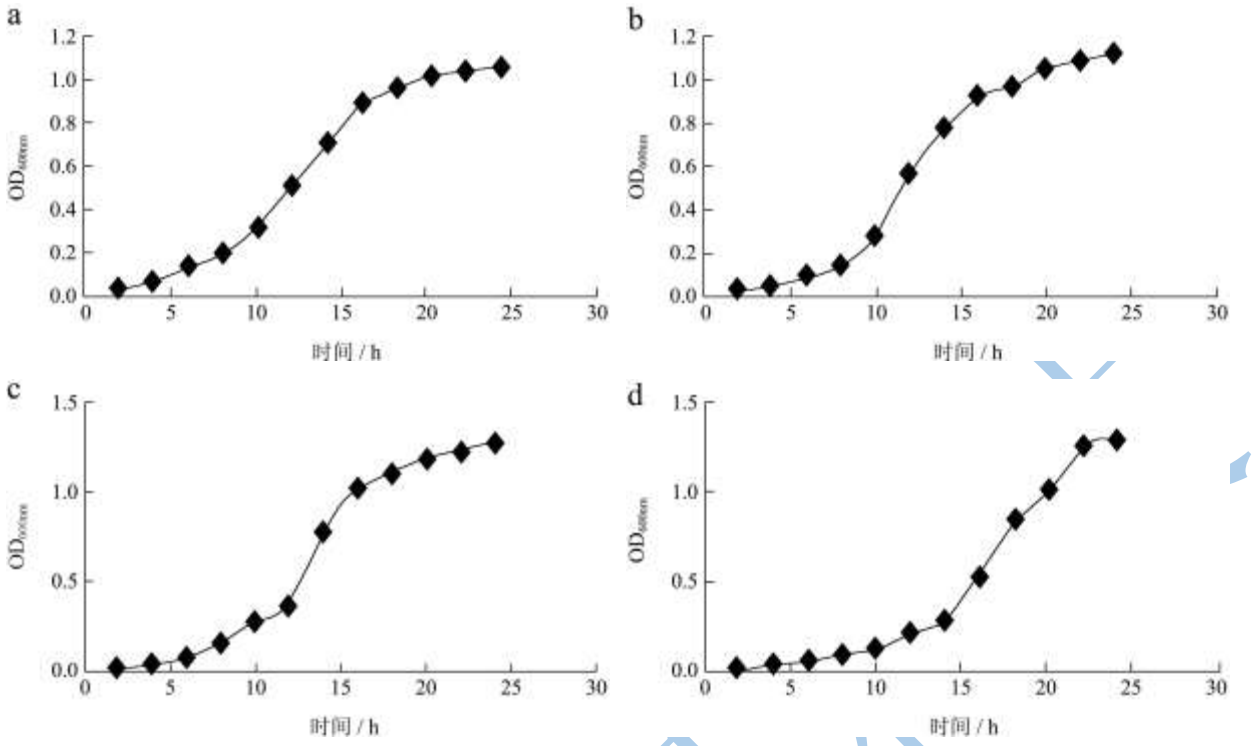


图 3 菌株生长曲线图

Fig.3 Growth curves of the *E. coli* strains and the lactic acid bactiera

注：a-O78 大肠杆菌生长曲线；b-O88 大肠杆菌生长曲线；c-O149 大肠杆菌生长曲线；d-乳酸菌生长曲线。

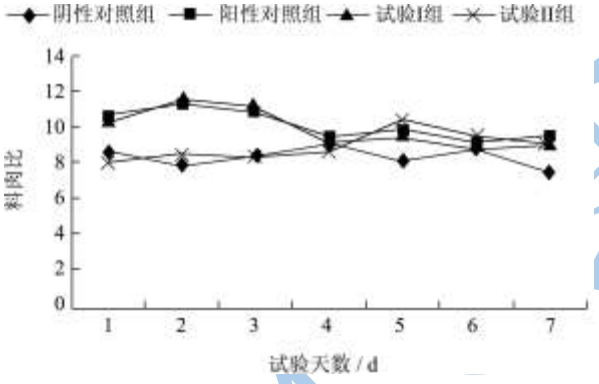


图 4 小鼠料肉比变化曲线图

Fig.4 Time course of meat-feeding stuff ratio of the mice

2.3.2 小鼠试验

结合图 4 和表 5 可以看出：

a.阴性对照组：虽然7 d里小鼠摄食量都出现波动，但变化不大，小鼠活动正常。

b.阳性对照组：在攻毒大肠杆菌之后，小鼠摄食量都减少，体重减轻快。后来，小鼠依靠自身的抵抗力，逐渐获得体重的上升，料肉比也变得平缓了。

c.试验I组：料肉比曲线的前半段与阳性对照组的一致，而后半段比阳性对照组提前获得了稳定的、较低的料肉比，这也证明了，小鼠在灌入乳酸菌后能有助于机体抵抗力。

表 5 大肠杆菌攻毒期间小鼠生长状况

Table 5 Growth of the mice in the challenged test

喂养时间/d	阴性对照组	阳性对照组	试验I组	试验II组
1	外表皮毛眼睛等正常，活动正常	6只发病，皮毛散乱，眼部出现脓肿症状，排泄部位有东西堵塞	有4只眼睛红肿，其它活动正常	外表皮毛眼睛等正常，活动正常
2	健康正常	全部相继发病，有1只病死	全部相继发病	健康正常
3	健康正常	3只病情有所好转，其它仍不好	2只好转，其它仍不好	健康正常
4	健康正常	没太大变化	5只好转	3只发病，皮毛散乱，眼部出现脓肿症状，排泄部位有东西堵塞
5	健康正常	5只病情有所好转	7只好转	发病鼠有所好转
6	健康正常	有6只病的好转，眼部红肿消失	大部分正常	大部分正常
7	健康正常	没太大变化	大部分正常	大部分正常
死亡率/%	0	10%	0	0

d.试验II组：料肉比曲线的前半段低而平缓，说明小鼠在灌入乳酸菌后，摄食量提高了，体重也容易增加，呈现良好的健康状态；后半段因灌入大肠杆菌而出现一小峰，但很快受到控制，比阳性对照组愈合得快。

表 6 攻毒致病菌不同时期小鼠粪便的乳酸菌含量（cfu/g）

Table 6 Lactic acid bacteria contents in dung of the mice in the challenged test

饲喂时间/d	阴性对照组	阳性对照组	试验 I 组	试验 II 组
0	2.71×10^5	2.46×10^6	1.92×10^6	3.62×10^5
4	1.42×10^6	2.20×10^5	1.65×10^7	2.17×10^7
7	1.67×10^7	1.7×10^5	5.46×10^7	8.13×10^6

表 7 攻毒致病菌不同时期小鼠粪便的大肠杆菌含量（cfu/g）

Table 7 *E. coli* contents in dung of the mice in the challenged test

饲喂时间/d	阴性对照组	阳性对照组	试验 I 组	试验 II 组
0	1.96×10^8	3.56×10^8	2.67×10^8	2.98×10^8
4	5.83×10^8	8.72×10^8	3.96×10^5	4.97×10^6
7	7.12×10^7	1.96×10^7	1.42×10^5	3.61×10^5

从表 6 和表 7 可以看出，实验进行前小鼠肠道内原来就存在一定数量的乳酸菌和大肠杆菌，乳酸菌较少，大肠杆菌较多。

a.阴性对照组：乳酸菌在小鼠体内呈增加趋势，大肠杆菌呈降低趋势，小鼠正常。

b.阳性对照组：乳酸菌逐渐减少，大肠杆菌增加迅速，大部分小鼠发病，甚至死亡。

c.试验 I 组：乳酸菌呈增加趋势，大肠杆菌呈降低趋势，小鼠正常。

d.试验 II 组：乳酸菌先是增加，攻毒致病菌后出现降低趋势，而灌入大肠杆菌后其数量不会快速攀升，继而趋向稳定，维持在一个较低水平。

综上判断，本实验的乳酸菌对大肠杆菌在小鼠试验上具有一定的治疗效果。

2.3.3 鸡试验

3 组鸡的死亡率为 0%。阴性对照组：其健康状况一直保持良好，料肉比比较平缓而逐渐升高。阳性对照组：鸡在连续灌入大肠杆菌的第 18 d 前，一直有明显出现腹泻现象，且食欲降低，体重下降快，料肉比升高快。直到第 18 d 后，其症状出现逐步舒缓。试验组：鸡在连续灌入大肠杆菌和乳酸菌的第 12 d 前，有出现腹泻现象，伴有轻微的食欲降低，体重下降了，料肉比升高。直到第 18 d 后，鸡基本恢复正常。综上判断，本实验的乳酸菌对大肠杆菌有一定的治疗效果。

3 结论

3.1 对于那些由抗生素引起的顽症和毒副作用,临床医学界主张采用生物防治方法，即以菌治菌，调整肠道微生态环境，重新建立起肠道正常菌群的平衡，保证机体正常的生理功能，达到防病、治病、保健、延年益寿的目的。用活乳酸杆菌制剂防治细菌性疾病，在选择性清除体病原菌的同时，发挥免疫激活作用，调节微生态平衡，提高机体非特异性抗感染能力，具有防治兼备的功效。更重要的是它不同于传统化学药物对病原体生理代谢的某一环节进行干扰或阻断的作用方式，因而不会产生抗药性，更不存在制剂的残留。

3.2 乳杆菌在预防肠道疾病及治疗腹泻方面有着重要意义。乳杆菌通过磷壁酸与肠粘膜上皮细胞形成一个生理屏障，提高定植阻力，对致病菌和条件致病菌的入侵有拮抗作用[13]。干酪乳杆菌可以增强肠道上皮细胞的屏障层从而阻止病原穿越上皮细胞乳酸杆菌在消化道内生成致密性膜菌群，形成微生物屏障，且乳酸杆菌具有促进上皮细胞修复功能，这样，一方面抑制消化道粘附病原菌、中和毒性产物，防止毒素和废物的吸收，另一方面提高上皮细胞对病原的抗侵袭力。动物在生病、受到创伤时，肠道的通透性会增加，结果导致抗原穿越上皮细胞而造成损害[14]。本试验 II 组中经连续 4 d 灌入活性干酪乳杆菌后的小鼠抵抗大肠杆菌的能力增强了，即便后来不再添加干酪乳杆菌仍然可以产生保护力。

参考文献

[1] 王玉文,刘英华.乳酸菌的生物拮抗作用[J].中国乳品工业,2008,36(2):55-57

[2] 森地敏树.日本乳酸菌的研究现状和发展趋势[J].中国供销商情(乳业导刊),2004,4:41-43

[3] Ewing W N. The Living Gut [M]. University of Nottingham England, 1994

[4] 范先超,秦春娥.益生素对仔猪生产性能的影响[J].江西畜牧兽医杂志,2003,4:24-25

[5] Prmenmtel M, Eyely J, Chow BA, et al.Eradication of mallintestinal bacterial overgrowthreduces symptoms of irritable bowel syndrome [J]. Am J Gatroenterol,2000, 95: 3503

[6] 王平,崔德凤,张永红.生芽孢乳酸菌TPY-211防治7日龄内仔猪腹泻的试验报告[J].中国畜牧兽医学会动物微生态学分会论文集,2001:128-130

[7] 食品科学系食品微生物教研室.微生物实验指导[M].广州:华南农业大学出版社,2006

[8] BüRGMANN H, PESARO M, WIDMER F, et al. A strategy for optimiz-ing quality and quantity of DNA extracted from soil [J]. J MicrobiolMeth, 2001, 45(1): 7-20

[9] 刘志恒.现代生物学[M].北京:科学出版社,2002

[10] 朱天贵.食品微生物学实验技术[M].北京:中国农业大学出版社,2002

[11] RE 布坎南, NE 吉本斯等.伯杰氏细菌鉴定手册[M].第九版.北京:科学出版社,1989

[12] 东秀珠,蔡妙英,等.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001,290-294

[13] 黄回,韩春茂.乳杆菌生态免疫营养在维护肠粘膜屏障中的作用[J].中华烧伤杂志,2005,2(21):155-157

[14] Marika Mikelsaar, Reet Mandar. Epp Sepp Lactic Acid Microflora in the Human Microbial Ecosystem and Its Development [C]. Seppo Salminenl Lactic Acid Bacteria, NewYork: Marcel Dekker, INC1 1998

现代食品科技