

# 云南撒尼地区乳饼及酸乳清中乳酸菌的鉴定及其生物多样性研究

杨希良, 陈少迁, 殷建忠, 潘红梅, 王琦, 王松梅, 吴志霜, 吴少雄  
(昆明医科大学公共卫生学院营养与食品科学系, 云南昆明 6500500)

**摘要:** 本研究对采自云南省石林彝族自治县5个不同地点的25份撒尼山羊奶乳饼和5份酸乳清样品进行了乳酸菌的分离, 了解乳酸菌的进化途径及各菌株间的亲缘关系。采用16S rRNA基因序列分析技术和传统理化特性研究相结合对乳酸菌种属进行鉴定, 同时绘制乳酸菌系统发育树, 对其序列进行分子系统发育分析。30份样品中73株乳酸菌疑似分离株进行属种鉴定, 46株杆菌分离株归属4个不同属中的13个种, 27株球菌分离株归属5个不同属中的9个种, 其中植物乳杆菌和融合魏斯氏菌分别占有所有分离株的19.18%和15.07%, 是云南撒尼山羊奶乳饼及酸乳清样品中的优势菌株, 云南撒尼山羊奶乳饼及酸乳清样品中的乳酸菌既丰富多样, 这可能与云南特有的地理、地貌和气候环境云南撒尼民族制作乳饼方法、凝乳时间、生活习惯、挤奶容器和卫生条件有关。

**关键词:** 乳饼; 乳酸菌; 分离; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2013)9-2131-2140

## Identification and Biodiversity of *Lactic Acid Bacteria* Species in Sani Dairy Cake and Acid Whey for Dairy Cake in Yunnan

YANG Xi-liang, CHEN Shao-qian, YIN Jian-zhong, PAN Hong-mei, WANG Qi, WANG Song-mei, WU Zhi-shuang, WU Shao-xiong

(Nutrition and Food Institute, School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

**Abstract:** *Lactic acid bacteria* were isolated from 25 goat milk cakes and 5 acid whey samples produced in Shilin, Yunnan, to investigate evolutionary path of *lactic acid bacteria* and the genetic relationship between different bacterial strains. The bacteria were then identified by combination of sequencing 16S rRNA gene and the classical identification methods. Among 73 strains isolated from 30 samples, 46 *Bacilli* were of 13 strains from 4 different genera. And 27 *Cocci* were of 9 strains from 5 different genera goat milk cakes, among which *Lactobacillus plantarum* and *Weissella confusa* were dominant strains accounting for the 19.18% and 15.07%, respectively of these isolated strains. *Lactic acid bacteria* was diversity, which might be due to geographical environment, geomorphic feature, climate condition, producing method, curd time, living habits, milk containers and sanitary condition of Yunnan-Sani.

**Key words:** dairy cake; *Lactic acid bacteria*; isolation; identification

云南石林彝族自治县撒尼族地区处中亚热带湿润区, 境内多山区、半山区, 山连山之间有着星罗棋布的天然牧场, 水草丰茂, 适宜放牧, 是全国奶山羊基地县<sup>[1]</sup>。该地区发酵乳制品一直沿用传统的自然发酵法生产, 生产模式也一直沿用一家一户的传统。经过几千年的自然驯化, 这些传统发酵乳制品中的一些具有优良特性和益生作用的微生物被保留了下来并较好地保存了其中有益微生物的生物学特性, 山羊奶乳饼蕴藏着丰富的乳酸菌资源, 是探索未知和有益乳酸菌

菌种的绝好宝库。如今, 各国人民对食品的要求更高了, 食品的摄入不仅仅再是为了摄取必需的营养素维持生存, 而且还要求食品同时具有调节机体生理活动的功能, 因此从庞大的传统发酵食品宝库中发掘功能性微生物再次成为科研工作者的研究热点。然而这些丰富的乳酸菌资源中也存在着一些菌株可引起人、畜患病, 甚至是临床上重要的病原菌, 或者因其在机体中所处环境的改变可能会对健康有害<sup>[2]</sup>, 只有全面、正确地认识和了解它们的特性, 才能在生活中和生产实践中充分利用乳酸菌等微生物资源。乳酸菌的鉴定和分类主要有经典分类鉴定方法和现代分子生物学分类鉴定方法。经典方法根据细菌的菌落特征、菌体形态、生理生化反应、生态特性、生活史特点等信息对微生

收稿日期: 2013-06-04

基金项目: 云南省科技计划项目(200700047R)

作者简介: 杨希良(1987-), 男, 在读硕士, 研究方向: 食品营养与健康

通讯作者: 吴少雄(1965-), 男, 教授, 研究方向: 食品营养与健康

物进行鉴定分类,但耗时、耗力,结果表现,不能体现生物的遗传本质,鉴定结果较不稳定,分子生物学方法鉴定乳酸菌虽然具有快速、准确、灵敏的优点,但仍有部分乳酸菌难以用此法鉴定。两种方法都存在优缺点,都无法单独胜任对乳酸菌进行属种鉴定。本研究采用经典分类鉴定方法和现代分子生物学技术相结合,对分离自云南撒尼地区乳饼及酸乳清中的乳酸菌进行属种鉴定,两种方法结合相互弥补不足,结果更加科学、客观和可信;同时绘制乳酸菌系统发育树,对其序列进行分子系统发育分析,以了解乳酸菌的进化途径及各菌株间的亲缘关系。

## 1 实验材料

### 1.1 培养基

MRS (De Man-Rogosa-Sharpe broth) 培养基(英国 Oxoid 公司); 营养肉汤 (NB) 培养基(广东环凯微生物科技有限公司); MRS (De Man-Rogosa-Sharpe broth) 培养基、马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基,英国 Oxoid 公司。

### 1.2 实验试剂

灭菌 0.9% 生理盐水 (NS);  $\text{CaCO}_3$ , 北京贵兴达工贸中心; 溴甲酚紫, 上海卓康生物科技有限公司; 革兰氏染色液, 广东环凯微生物科技有限公司; 3% 过氧化氢水溶液, 上海远大过氧化物有限公司; 丙三醇, 广州市林盛化工有限公司; 十二烷基硫酸钠 SDS, Sigma 公司; 蛋白酶 K, 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 异丙醇, 北京益利精细化学品有限公司; 琼脂糖, 上海贝基生物科技有限公司; DNA Marker, 大连宝生物工程有限公司;  $10\times\text{TE}$  buffer, 缓冲液; 十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 裂解液; 苯酚-氯仿-异戊醇(上海肯强仪器有限公司); 氯仿-异戊醇, 上海肯强仪器有限公司;  $50\times\text{TAE}$  buffer;  $10\times\text{Loading}$  buffer; 溴化乙啶 EB; UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒, 上海生工生物工程技术有限公司。

### 1.3 主要仪器

BHC-1000IIA/B3 单人单面生物安全柜; GRX-9123A 干热灭菌消毒箱; 高压灭菌锅; 恒温空气浴摇床; GHP-9160 隔水式生物恒温培养箱; 1-14 微量台式高速离心机; Sigma3-18K 4 °C 台式冷冻高速离心机; IC20 恒温金属浴; 240 型真空干燥器; DW-YW508A 卧式-20 °C 生物冷冻冰箱; MDF-U32V 立式超低温冰箱; MG720FC8-NS 微波炉; MP-SK24

小型水平电泳槽; InGenius IG/LHR 凝胶成像分析系统; ZB90 制冰机; PCR System 2720 普通 PCR 仪; TR-1A 温控恒温水浴槽。

### 1.4 软件

GeneSnap Version 7.02: 用于凝胶电泳后采集图像。Chromas Version 2.23: 用于查看和处理测序峰图。Editseq: 用于输入、修改 DNA 或蛋白质的序列。ClustalX 2.0.12: 用于校准、排齐、比对基因序列。MEGA 4: 用于构建系统发育树。

## 2 实验方法

### 2.1 样品的采集

将 25 份山羊奶乳饼和 5 份酸乳清样品置于无菌容器内, 带回实验室后转放 4 °C 冰箱。

### 2.2 样品稀释液 pH 值测定

对乳饼样品, 从其表面和内部各取 10 g, 置于同一研钵内研碎, 加入 180 mL 灭菌 0.9% NS, 充分混匀, 配制成样品 10 倍稀释液; 置样品稀释液、酸乳清样品于 27 °C 的水浴中若干分钟后, 用酸度计测定其 pH 值。

### 2.3 涂布培养

用经灭菌的 0.9% NS 配制一系列的 10 倍样品梯度稀释液, 取  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  三个稀释度的稀释液各 25  $\mu\text{L}$ , 分别涂布于 NA 培养基和 MRSA 培养基上, 另取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  三个稀释度的稀释液各 25  $\mu\text{L}$ , 分别涂布于 PDA 培养基上, 每个稀释度每种固体培养基各涂两块, 同时, 在另一灭菌平板上滴加等量稀释用的 NS 做为空白对照。涂布均匀后, 标记, NA 培养基和 MRSA 培养基置于  $(36\pm 1)$  °C 恒温培养箱中, 倒置培养 72 h, PDA 培养基置于  $(27\pm 1)$  °C 恒温培养箱中, 倒置培养 5 d, 观察记录菌落形态特征。

### 2.4 菌落计数

菌落总数的测定、乳酸菌总数的测定、霉菌和酵母计数按照《食品卫生微生物学检验》中 GB/T 4789.2-2003、GB/T 4789.35-2003、GB/T 4789.15-2003 执行。

### 2.5 菌种保存

从 NA 和 MRSA 两种固体培养基上挑取不同形态的单菌落接种于 MRS 肉汤培养基, 置于  $(36\pm 1)$  °C

摇床培养 24 h。培养结束后, 将培养液与灭菌甘油以 8:2 的比例在 1 mL 菌种保存管内混匀, 置于 -80 °C 冰箱中冷冻保存, 每个菌种保存 2 管。

## 2.6 菌种培养液 pH 值测定

将取自两种固体培养基的单菌落 24 h MRS 培养液置于 27 °C 水浴中若干分钟, 用酸度计测定 pH 值。

## 2.7 过氧化氢酶实验

在装有 2 mL 单菌种 24 h MRS 培养液的试管内, 沿管壁加入 2 mL 3% 过氧化氢水溶液, 混匀后观察。半分钟内有气泡产生为阳性, 没有气泡产生则为阴性。为便于观察和确保结果科学、可靠, 应同时用标准菌株做阴性 (链球菌) 和阳性 (金黄色葡萄球菌) 对照。

## 2.8 菌落形态观察

用灭菌 0.9% NS 配制单菌种 24 h MRS 培养液的一系列 10 倍梯度稀释液, 取两个适宜稀释度的稀释液各 25  $\mu$ L, 涂布于紫色 MRSA 培养基上, 每个稀释度每种固体培养基各涂 1 块, 同时在另一灭菌平板上滴加等量稀释用的 NS 做为空白对照。涂布均匀后, 标记, 置于 (36 $\pm$ 1) °C 恒温培养箱中, 倒置培养 72 h, 观察记录菌落形态特征并拍照保存。菌落形态特征的观察记录内容包括: 颜色、外形、大小、表面光泽、透明度、隆起、边缘、质地、溶钙圈。

## 2.9 革兰氏染色与镜检

从培养后的紫色 MRSA 培养基上挑取些许菌落进行革兰氏染色。具体操作: 制片 $\rightarrow$ 固定 $\rightarrow$ 染色 $\rightarrow$ 水洗 $\rightarrow$ 脱色 $\rightarrow$ 复染 $\rightarrow$ 镜检。将已染色的玻片置于光学显微镜下, 观察记录菌体形状和颜色, 菌体呈蓝紫色为阳性, 呈浅红色为阴性。

## 2.10 菌体培养

将冷冻保藏于 -80 °C 冰箱中的乳酸菌纯菌种取出, 置于生物安全柜内, 待其融解液化后, 混匀, 用微量移液器取 10  $\mu$ L 接种于 5 mL 灭菌 MRS 肉汤培养基中, 置于 (36 $\pm$ 1) °C 摇床培养 24 h。

## 2.11 分离菌株分子生物学鉴定

### 2.11.1 主要步骤

采用 CTAB 裂解法提取乳酸菌纯菌种的基因组 DNA $\rightarrow$ 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对提取的基因组 DNA 的质量进行检测 $\rightarrow$ 普通 PCR 对乳酸菌纯菌种的 16S rDNA 进行扩增 $\rightarrow$ 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测 $\rightarrow$ 采用 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化 $\rightarrow$ 采用 1% 琼脂

糖凝胶电泳对纯化后的 PCR 产物进行检测 $\rightarrow$ 纯化后的 PCR 产物采用 ABI3700 基因测序仪测序

### 2.11.2 序列分析

先用 Chromas 查看测序峰图, 确定合格序列的起止, 再在 Editseq 中复制拟比对序列, 登陆网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 进行序列比对, 结合形态学特征和理化特性即可确定与比对的目的基因序列同源性最高的已知分类地位的菌种。

### 2.11.3 系统发育树的构建与分析

从 GenBank 数据库中下载相应乳酸菌属相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 与 73 株所测菌株的 16S rDNA 序列一起, 用 ClustalX 2.0.12 进行校准、排齐、多重比对, 得到同源性相似百分比, 再采用 MEGA 4 生物学软件构建系统发育树, 采用 Neighbor-Joining 法进行系统发育分析, 并进行 1000 次重复的 Boot-straps 统计学检验。

## 3 实验结果

### 3.1 样品稀释液的 pH 值

所有山羊奶乳饼样品的 10 倍稀释液和酸乳清样品及稀释用灭菌 0.9% NS 在 27 °C 条件下的 pH 值如表 1 所示。

表 1 样品及其稀释液的 pH 值

Table 1 pH values of samples and their diluents

测定对象	pH 值
石林镇北大村山羊奶乳饼 SDC1 10 倍稀释液	6.5
石林镇北大村山羊奶乳饼 SDC2 10 倍稀释液	6.1
石林镇双西村山羊奶乳饼 SDC3 10 倍稀释液	6.2
石林镇双西村山羊奶乳饼 SDC4 10 倍稀释液	6.3
石林镇半坑村山羊奶乳饼 SDC5 10 倍稀释液	6.0
西街口镇西街村山羊奶乳饼 XDC1 10 倍稀释液	5.9
西街口镇西街村山羊奶乳饼 XDC2 10 倍稀释液	6.3
西街口镇紫处村山羊奶乳饼 XDC3 10 倍稀释液	6.4
西街口镇紫处村山羊奶乳饼 XDC4 10 倍稀释液	6.6
西街口镇糯衣村山羊奶乳饼 XDC5 10 倍稀释液	6.2
亩竹箐乡亩竹箐村山羊奶乳饼 MDC1 10 倍稀释液	6.5
亩竹箐乡亩竹箐村山羊奶乳饼 MDC2 10 倍稀释液	6.1
亩竹箐乡红路口村山羊奶乳饼 MDC3 10 倍稀释液	5.9
亩竹箐乡红路口村山羊奶乳饼 MDC4 10 倍稀释液	6.4
亩竹箐乡海纳村山羊奶乳饼 MDC5 10 倍稀释液	6.5
圭山镇大糯黑村山羊奶乳饼 GDC1 10 倍稀释液	6.4
圭山镇大糯黑村山羊奶乳饼 GDC2 10 倍稀释液	6.3
圭山镇水补衣村山羊奶乳饼 GDC3 10 倍稀释液	5.8

转下页

接上页		13	MDC3	$7.2 \times 10^8$	$1.1 \times 10^9$	$7.6 \times 10^4$
圭山镇水补衣村山羊奶乳饼 GDC4 10 倍稀释液	6.0	14	MDC4	$7.0 \times 10^8$	$7.2 \times 10^8$	$6.4 \times 10^4$
圭山镇当甸村山羊奶乳饼 GDC5 10 倍稀释液	6.6	15	MDC5	$1.5 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$	$4.4 \times 10^5$
维则乡维则村山羊奶乳饼 WDC1 10 倍稀释液	6.4	16	GDC1	$2.6 \times 10^8$	$2.8 \times 10^8$	$8.4 \times 10^4$
维则乡维则村山羊奶乳饼 WDC2 10 倍稀释液	6.1	17	GDC2	$3.6 \times 10^8$	$1.3 \times 10^9$	$8.6 \times 10^4$
维则乡阿着底村山羊奶乳饼 WDC3 10 倍稀释液	6.6	18	GDC3	$4.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^9$	$4.2 \times 10^5$
维则乡阿着底村山羊奶乳饼 WDC4 10 倍稀释液	6.3	19	GDC4	$4.5 \times 10^8$	$1.1 \times 10^9$	$2.7 \times 10^4$
维则乡豆黑村山羊奶乳饼 WDC5 10 倍稀释液	6.3	20	GDC5	$5.6 \times 10^8$	$6.1 \times 10^8$	$3.6 \times 10^4$
石林镇北大村酸乳清 SAW	3.3	21	WDC1	$3.0 \times 10^8$	$6.6 \times 10^8$	$3.6 \times 10^4$
石林镇北大村酸乳清 SAW 10 倍稀释液	3.5	22	WDC2	$5.0 \times 10^7$	$1.6 \times 10^8$	$2.5 \times 10^4$
西街口镇西街村酸乳清 XAW	2.9	23	WDC3	$8.5 \times 10^8$	$7.9 \times 10^8$	$6.1 \times 10^4$
西街口镇西街村酸乳清 XAW 10 倍稀释液	3.1	24	WDC4	$1.0 \times 10^9$	$9.5 \times 10^8$	$3.7 \times 10^4$
亩竹箐乡亩竹箐村酸乳清 MAW	3.1	25	WDC5	$6.7 \times 10^8$	$7.0 \times 10^8$	$4.3 \times 10^4$
亩竹箐乡亩竹箐村酸乳清 MAW 10 倍稀释液	3.3	26	SAW	$8.9 \times 10^8$	$1.1 \times 10^9$	$3.2 \times 10^3$
圭山镇大糯黑村酸乳清 GAW	2.7	27	XAW	$1.4 \times 10^9$	$1.3 \times 10^9$	$3.0 \times 10^4$
圭山镇大糯黑村酸乳清 GAW 10 倍稀释液	2.8	28	MAW	$1.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^8$	$3.1 \times 10^4$
维则乡维则村酸乳清 WAW	3.2	29	GAW	$1.7 \times 10^8$	$2.4 \times 10^8$	$5.3 \times 10^3$
维则乡维则村酸乳清 WAW 10 倍稀释液	3.4	30	WAW	$7.4 \times 10^7$	$2.3 \times 10^8$	$3.6 \times 10^3$
灭菌 0.9% NS	7.5					

表 1 可知, 25 份山羊奶乳饼样品的 10 倍稀释液的 pH 值为 5.8~6.6, 平均为  $6.3 \pm 0.23$ , 5 份酸乳清样品的 pH 值为 2.7~3.3, 平均为  $3.0 \pm 0.24$ , 对应的 5 份酸乳清 10 倍稀释液的 pH 值为 2.8~3.5, 平均为  $3.2 \pm 0.28$ 。

### 3.2 样品中优势微生物种群分析

分别采用 NA、MRSA、PDA 分离培养乳饼及酸乳清样品中的一般细菌、乳酸菌、酵母菌, 三者在各样品中的菌落数如表 2 所示。

表 2 样品中一般细菌、乳酸菌、酵母菌计数 (cfu/g 或 cfu/mL)

Table 2 Colony counting of aerobic bacteria, lactic acid bacteria and yeast

序号	样品编号	菌落总数	乳酸菌数	酵母菌数
1	SDC1	$2.1 \times 10^8$	$3.7 \times 10^8$	$1.7 \times 10^4$
2	SDC2	$3.7 \times 10^8$	$7.3 \times 10^8$	$7.8 \times 10^4$
3	SDC3	$9.7 \times 10^8$	$1.1 \times 10^9$	$1.4 \times 10^4$
4	SDC4	$1.5 \times 10^8$	$2.8 \times 10^8$	$2.7 \times 10^4$
5	SDC5	$5.7 \times 10^8$	$5.9 \times 10^8$	$5.7 \times 10^4$
6	XDC1	$7.9 \times 10^7$	$1.3 \times 10^8$	$7.5 \times 10^4$
7	XDC2	$2.3 \times 10^8$	$2.6 \times 10^8$	$7.8 \times 10^4$
8	XDC3	$7.8 \times 10^8$	$1.2 \times 10^9$	$1.5 \times 10^4$
9	XDC4	$1.2 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$	$6.4 \times 10^4$
10	XDC5	$2.3 \times 10^8$	$5.7 \times 10^8$	$6.2 \times 10^4$
11	MDC1	$2.8 \times 10^7$	$3.9 \times 10^7$	$7.5 \times 10^4$
12	MDC2	$4.1 \times 10^8$	$1.0 \times 10^9$	$7.5 \times 10^4$

由表 2 可知, 在 25 份山羊奶乳饼样品中, 有 4 份菌落总数在  $(1.2 \sim 7.9) \times 10^7$  cfu/g 之间, 有 20 份菌落总数在  $(1.5 \sim 9.7) \times 10^8$  cfu/g 之间, 有 1 份菌落总数为  $1.0 \times 10^9$  cfu/g; 有 2 份乳酸菌数分别为  $1.6 \times 10^7$  cfu/g 和  $3.9 \times 10^7$  cfu/g, 有 16 份乳酸菌数在  $(1.3 \sim 9.5) \times 10^8$  cfu/g 之间, 有 7 份乳酸菌数在  $(1.0 \sim 1.3) \times 10^9$  cfu/g 之间; 有 23 份酵母菌数在  $(1.4 \sim 8.6) \times 10^4$  cfu/g 之间, 有 2 份酵母菌数分别为  $4.2 \times 10^5$  cfu/g 和  $4.4 \times 10^5$  cfu/g。

在 5 份酸乳清样品中, 有 1 份菌落总数为  $7.4 \times 10^7$  cfu/mL, 有 3 份菌落总数在  $(1.0 \sim 8.9) \times 10^8$  cfu/mL 之间, 有 1 份菌落总数为  $1.4 \times 10^9$  cfu/mL; 有 3 份乳酸菌数在  $(1.0 \sim 2.4) \times 10^8$  cfu/mL 之间, 有 2 份乳酸菌数分别为  $1.1 \times 10^9$  cfu/mL 和  $1.3 \times 10^9$  cfu/mL; 酵母菌数均在  $3.2 \times 10^3 \sim 3.1 \times 10^4$  cfu/mL。

### 3.3 分离株的菌落形态特征

从 30 份样品中共分离到 73 株单克隆菌株。分离株在乳酸菌选择性培养基 MRSA 上培养 72 h 的菌落形态大体可分为以下九种 (如图 1 所示):

I. 白色, 近圆形, 直径约 3 mm, 表面湿润, 不透明, 隆起, 边缘较整齐, 质地均匀, 菌落周围有溶钙圈, 如图 1 I 所示。

II. 同心圆饼状, 直径约 2 mm, 外环灰白色, 中央为直径约 1.2 mm 的棕黄色圆斑, 表面湿润, 不透明, 隆起, 边缘较整齐, 质地均匀, 菌落周围有溶钙圈, 如图 1 II 所示。

III. 整个菌落为白色, 菌落中央呈蛋黄色, 直径为

2.5~4 mm 不等, 表面湿润, 不透明, 隆起, 边缘整齐, 质地均匀, 菌落周围有溶钙圈, 若干单菌落呈链状排列, 如图 1 II 所示。

IV. 银白色, 近圆形, 直径约 3 mm, 菌落中央有一直径约 1.5 mm 的环形凹槽, 表面湿润, 不透明, 隆起, 边缘较整齐, 质地均匀, 菌落周围有溶钙圈, 如图 1 IV 所示。

V. 浅白色, 近圆形, 直径为 8~10 mm 不等, 表面湿润, 不透明, 扁平, 边缘有许多毛状突起, 质地均匀, 菌落周围有溶钙圈, 如图 1 V 所示。

VI. 乳白色, 圆形, 直径约 12 mm, 表面湿润, 不透明, 扁平, 边缘整齐, 质地均匀, 菌落周围有溶钙圈, 如图 1 VI 所示。

VI. 浅白色, 近椭圆形, 大小约 20 mm×25 mm, 表面干燥、多皱, 呈树枝状隆起, 由外周向中央呈放射状, 菌落中央有鼻状突起, 不透明, 隆起, 边缘凹凸不平, 菌落周围有溶钙圈, 如图 1 VI 所示。

VIII. 淡黄色, 圆形, 直径约 1.5~3 mm 不等, 表面湿润, 不透明, 隆起, 边缘整齐, 质地均匀, 菌落周围有溶钙圈, 如图 1 VIII 所示。

IX. 无色, 圆形, 似水珠, 直径约 1.2 mm, 表面湿润, 透明, 隆起, 边缘整齐, 质地均匀, 菌落周围有溶钙圈, 如图 1 IX 所示。

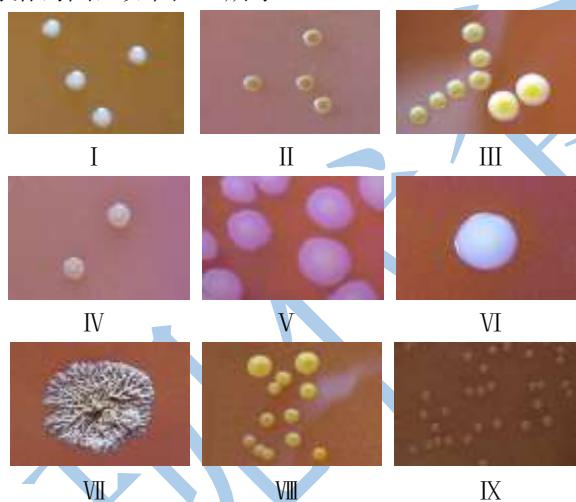


图 1 分离株的菌落形态分类

Fig.1 Classification of the isolates according to their colony morphology

### 3.4 分离株的菌体细胞形态特征

分离株在乳酸菌选择性培养基 MRSA 上培养 72 h 后, 行革兰氏染色, 在显微镜下观察显示, 所有菌株的菌体细胞形态大致可分为以下五种 (如图 2 所示):

亮紫色, 粗短杆状, 成堆排列, 如图 2a 所示;  
深紫色, 粗长杆状, 散在成簇排列, 如图 2b 所示;

紫红色, 细长杆状, 呈长链状排列, 如图 2c 所示;  
浅红色, 细长杆状, 散在或成堆排列, 如图 2d 所示;

蓝紫色, 圆形, 散在成双或成簇排列, 如图 2e 所示。

紫黑色, 椭圆形, 散在或成堆排列, 如图 2f 所示;  
其中, c 为革兰染色阴性, 其余 5 种记为革兰染色阳性。

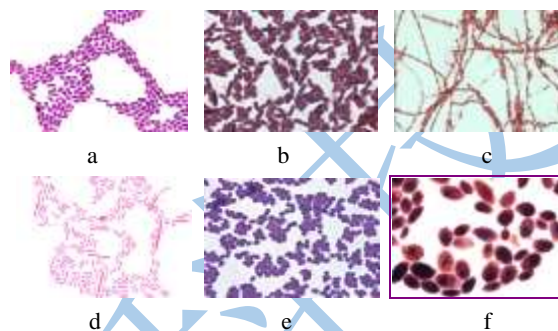


图 2 分离株的菌体细胞形态分类 (革兰染色, ×1000)

Fig.2 Classification of the isolates according to the cell morphology (Gram stain, ×1000)

### 3.5 分离株的理化特性与形态学特征

分离自所有样品的 73 株分离株的菌落形态、菌体细胞形态及其 24h MRS 培养液的 pH 值、过氧化氢酶实验结果如表 3 所示。

表 3 所有分离株的理化特性与形态学特征

Table 3 Physicochemical properties and morphological characteristics of all isolates

序号	菌株编号	菌落形态	菌体细胞形态	培养液 pH 值	培养液 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 酶
1	SDC1-1	III	b	4.0	-
2	SDC1-2	III	b	3.4	-
3	SDC1-3	I	e	4.3	-
4	SDC2-1	I	e	4.3	-
5	SDC2-2	I	e	3.9	-
6	SDC2-3	I	b	3.9	-
7	SDC3-1	III	b	4.2	-
8	SDC3-2	III	b	3.9	-
9	SDC4-1	III	b	3.4	-
10	SDC4-2	IV	c	5.4	-
11	SDC4-3	I	e	4.0	-
12	SDC5-1	III	b	4.3	-
13	SDC5-2	IX	f	4.0	-
14	XDC1-1	III	b	4.2	-
15	XDC1-2	I	e	4.6	-

转下页

接上页						60	WDC5-1	V	e	4.4	-
16	XDC2-1	III	b	3.7	-	61	WDC5-2	III	b	4.2	-
17	XDC2-2	I	e	3.9	-	62	WDC5-3	III	b	4.1	-
18	XDC2-3	I	e	3.9	-	63	SAW-1	III	b	4.1	-
19	XDC3-1	IV	c	5.8	-	64	SAW-2	III	b	3.4	-
20	XDC3-2	I	e	4.1	-	65	XAW-1	III	b	3.4	-
21	XDC3-3	I	e	4.1	-	66	XAW-2	III	b	3.9	-
22	XDC4-1	I	b	4.0	-	67	MAW-1	III	b	4.1	-
23	XDC4-2	III	b	3.7	-	68	MAW-2	III	b	3.6	-
24	XDC5-1	III	b	4.1	-	69	GAW-1	III	b	3.4	-
25	XDC5-2	I	e	4.2	-	70	GAW-2	VII	c	6.5	+
26	MDC1-1	III	b	3.8	-	71	GAW-3	III	a	4.8	-
27	MDC1-2	IV	c	5.8	+	72	WAW-1	III	b	3.4	-
28	MDC2-1	III	b	4.2	-	73	WAW-2	III	b	3.5	-
29	MDC2-2	II	e	4.9	-						
30	MDC2-3	VIII	d	3.7	-						
31	MDC3-1	I	e	4.3	-						
32	MDC3-2	I	e	4.2	-						
33	MDC4-1	III	b	4.1	-						
34	MDC4-2	I	e	4.8	-						
35	MDC5-1	III	b	4.0	-						
36	MDC5-2	I	e	4.5	-						
37	MDC5-3	III	b	4.2	-						
38	GDC1-1	I	e	4.3	-						
39	GDC1-2	I	e	4.3	-						
40	GDC1-3	II	c	5.7	-						
41	GDC2-1	I	e	3.8	-						
42	GDC2-2	III	a	4.8	-						
43	GDC3-1	I	e	4.0	-						
44	GDC3-2	IV	c	5.2	-						
45	GDC3-3	I	e	4.3	-						
46	GDC4-1	III	b	3.5	+						
47	GDC4-2	I	e	4.1	-						
48	GDC4-3	I	e	4.1	-						
49	GDC5-1	VII	c	7.4	+						
50	GDC5-2	III	b	4.2	-						
51	GDC5-3	III	b	4.2	-						
52	WDC1-1	III	b	3.7	-						
53	WDC1-2	I	e	3.8	-						
54	WDC2-1	VI	b	4.4	-						
55	WDC2-2	III	b	4.1	-						
56	WDC3-1	I	f	5.5	+						
57	WDC3-2	III	b	4.0	-						
58	WDC4-1	IV	c	3.8	-						
59	WDC4-2	III	b	4.2	-						

注:表中I~IX与图1中I~IX一致;a~f与图2中a~f一致。

73株分离株的培养液pH值最小低至3.4,除了一株为7.4外,其余菌株均在6.5以下;仅有1株分离株的菌体革兰染色呈阴性,其余均为阳性;过氧化氢酶实验仅有5株为阳性,其余均为阴性。

### 3.6 离株属种鉴定

结合菌株形态学特征、理化特性和测定序列比对情况,对73株分离株进行属种鉴定,结果如表4所示。

表4 乳饼及酸乳清样品中73株分离株的属种鉴定结果

序号	菌株编号	英文属种	中文菌名
1	SDC1-1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳酸杆菌
2	SDC1-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
3	SDC1-3	<i>Enterococcus faecium</i>	屎肠球菌
4	SDC2-1	<i>Lactococcus lactis</i>	乳酸乳球菌
5	SDC2-2	<i>Pedococcus pentosaceus</i>	戊糖片球菌
6	SDC2-3	<i>Lactobacillus casei</i>	干酪乳杆菌
7	SDC3-1	<i>Weissella confusa</i>	融合乳杆菌
8	SDC3-2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌
9	SDC4-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
10	SDC4-2	<i>Bacillus cereus</i>	蜡状芽孢杆菌
11	SDC4-3	<i>Pedococcus acidilactici</i>	乳酸片球菌
12	SDC5-1	<i>Weissella confusa</i>	融合乳杆菌
13	SDC5-2	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	假肠膜明串珠菌
14	XDC1-1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-
15	XDC1-2	<i>Enterococcus faecium</i>	屎肠球菌

转下页

接上页			
16	XDC2-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
17	XDC2-2	<i>Pedicoccus pentosaceus</i>	戊糖片球菌
18	XDC2-3	<i>Pedicoccus pentosaceus</i>	戊糖片球菌
19	XDC3-1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	苏云金芽孢杆菌
20	XDC3-2	<i>Pedicoccus acidilactici</i>	乳酸片球菌
21	XDC3-3	<i>Pedicoccus acidilactici</i>	乳酸片球菌
22	XDC4-1	<i>Lactobacillus casei</i>	干酪乳杆菌
23	XDC4-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
24	XDC5-1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-
25	XDC5-2	<i>Pedicoccus pentosaceus</i>	戊糖片球菌
26	MDC1-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
27	MDC1-2	<i>Bacillus cereus</i>	蜡状芽孢杆菌
28	MDC2-1	<i>Weissella confusa</i>	融合乳杆菌
29	MDC2-2	<i>Staphylococcus simulans</i>	模仿葡萄球菌
30	MDC2-3	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	植物乳杆菌
31	MDC3-1	<i>Lactococcus lactis</i>	乳酸乳球菌
32	MDC3-2	<i>Pedicoccus acidilactici</i>	乳酸片球菌
33	MDC4-1	<i>Weissella confusa</i>	融合乳杆菌
34	MDC4-2	<i>Enterococcus durans</i>	耐久肠球菌
35	MDC5-1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-
36	MDC5-2	<i>Pedicoccus pentosaceus</i>	戊糖片球菌
37	MDC5-3	<i>Weissella confusa</i>	融合乳杆菌
38	GDC1-1	<i>Lactococcus lactis</i>	乳酸乳球菌
39	GDC1-2	<i>Lactococcus lactis</i>	乳酸乳球菌
40	GDC1-3	<i>Citrobacter freundii</i>	弗氏柠檬酸杆菌
41	GDC2-1	<i>Pedicoccus pentosaceus</i>	戊糖片球菌
42	GDC2-2	<i>Lactobacillus brevis</i>	短乳杆菌
43	GDC3-1	<i>Pedicoccus pentosaceus</i>	戊糖片球菌
44	GDC3-2	<i>Bacillus cereus</i>	蜡状芽孢杆菌
45	GDC3-3	<i>Enterococcus durans</i>	耐久肠球菌
46	GDC4-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
47	GDC4-2	<i>Pedicoccus acidilactici</i>	乳酸片球菌
48	GDC4-3	<i>Pedicoccus acidilactici</i>	乳酸片球菌
49	GDC5-1	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌
50	GDC5-2	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	消化乳杆菌
51	GDC5-3	<i>Weissella confusa</i>	融合乳杆菌
52	WDC1-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
53	WDC1-2	<i>Pedicoccus acidilactici</i>	乳酸片球菌
54	WDC2-1	<i>Weissella cibaria</i>	-
55	WDC2-2	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-
56	WDC3-1	<i>Leuconostoc lactis</i>	乳明串珠菌
57	WDC3-2	<i>Weissella confusa</i>	融合乳杆菌
58	WDC4-1	<i>Bacillus coagulans</i>	凝固芽孢杆菌

59	WDC4-2	<i>Weissella confusa</i>	融合乳杆菌
60	WDC5-1	<i>Lactococcus lactis</i>	乳酸乳球菌
61	WDC5-2	<i>Staphylococcus capitis</i>	头状葡萄球菌
62	WDC5-3	<i>Weissella confusa</i>	融合乳杆菌
63	SAW-1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌
64	SAW-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
65	XAW-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
66	XAW-2	<i>Weissella confusa</i>	融合乳杆菌
67	MAW-1	<i>Weissella confusa</i>	融合乳杆菌
68	MAW-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
69	GAW-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
70	GAW-2	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌
71	GAW-3	<i>Lactobacillus brevis</i>	短乳杆菌
72	WAW-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
73	WAW-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌

注：“-”表示尚无相应的中文菌名。

表5 饼及酸乳清样品中73株乳酸菌分离株的属种分布

Table 5 Species distribution of 73 lactic acid bacteria isolated from dairy cake and acid whey

序号	中文属名	菌株总数	组成		
			序号	菌株名	菌株数
1	乳杆菌属	22	1	植物乳杆菌	14
			2	发酵乳杆菌	3
			3	干酪乳杆菌	2
			4	短乳杆菌	2
			5	消化乳杆菌	1
2	魏斯氏菌属	16	6	融合魏斯氏菌	11
			<i>Weissella paramesenteroides</i>		
			7		4
			8	<i>Weissella cibaria</i>	1
3	片球菌属	14	9	乳酸片球菌	7
			10	戊糖片球菌	7
4	芽孢杆菌属	7	11	蜡状芽孢杆菌	3
			12	枯草芽孢杆菌	2
			13	凝固芽孢杆菌	1
			14	苏云金芽孢杆菌	1
5	乳球菌属	5	15	乳酸乳球菌	5
			16	屎肠球菌	2
6	肠球菌属	4	17	耐久肠球菌	2
			18	乳明串珠菌	1
7	明串珠菌属	2	19	假肠膜明串珠菌	1
			20	头状葡萄球菌	1
8	葡萄球菌属	2	21	模仿葡萄球菌	1
			22	弗氏柠檬酸杆菌	1

从25份云南撒尼山羊奶乳饼及5份酸乳清样品中

共分离到 73 株乳酸菌分离株, 包括 46 株杆菌分离株和 27 株球菌分离株, 共涵盖 9 个属 22 个种, 具体属种分布如表 5。

分离株属种鉴定结果表明, 乳饼及酸乳清样品中的乳酸菌多样性丰富, 乳杆菌属中的植物乳杆菌 (14 株) 和魏斯氏菌属中的融合魏斯氏菌 (11 株) 分别占所有分离株 (73 株) 的 19.18% 和 15.07%, 是云南撒尼乳饼及酸乳清样品中的优势菌株。

### 3.7 系统发育树的构建与分析

73 株乳酸菌分离株和 41 株参考菌株的系统发育树如图 3 所示。

由图 1 可知, 73 株乳酸菌分离株的 16S rDNA 序列中, 分别有 34 个、6 个、10 个、11 个、1 个、3 个、7 个、1 个序列与已知标准菌序列在种水平上的同源性依次为 100%、99%、98%、97%、70%、66%、64%、45%。

## 4 讨论

### 4.1 16S rRNA/DNA 序列分析在微生物分类

#### 鉴定中的应用

传统细菌分类鉴定的主要依据是形态特征和生理生化特性, 采取的主要方法是对细菌进行纯培养分离, 然后从形态学、生理生化反应特征以及血清学、免疫学特性加以鉴定。由于生理生化鉴定结果本身具有不确定性, 加之有些菌种生理生化性质相近, 单纯用传统的表型分类及糖发酵实验难以区分, 还必须依靠分子鉴定手段。rRNA 分子已成为一个广泛应用于各种微生物的遗传特征和分子差异研究的分子指标<sup>[3]</sup>, 可实现快速、微量、准确、简便地对微生物进行分类鉴定。16S rRNA 基因序列分析的基本原理就是先从微生物样品中直接提取总 DNA, 然后通过克隆、测序、酶切或探针杂交等方式获得微生物 16S rDNA 的序列信息, 再与 16S rDNA 数据库中的序列数据进行比对, 确定其在进化树中的位置, 从而鉴定样本中可能存在的微生物种类。细菌的 16S rDNA 恒定区序列基本保守, 能很好的体现不同菌属之间的差异, 又能用测序技术比较容易地得到其序列, 因此用 16S rDNA 是来鉴定细菌是一种很有效的方法<sup>[4]</sup>。

### 4.2 乳酸菌分离株的生存环境与样品中乳酸

#### 菌群分布分析

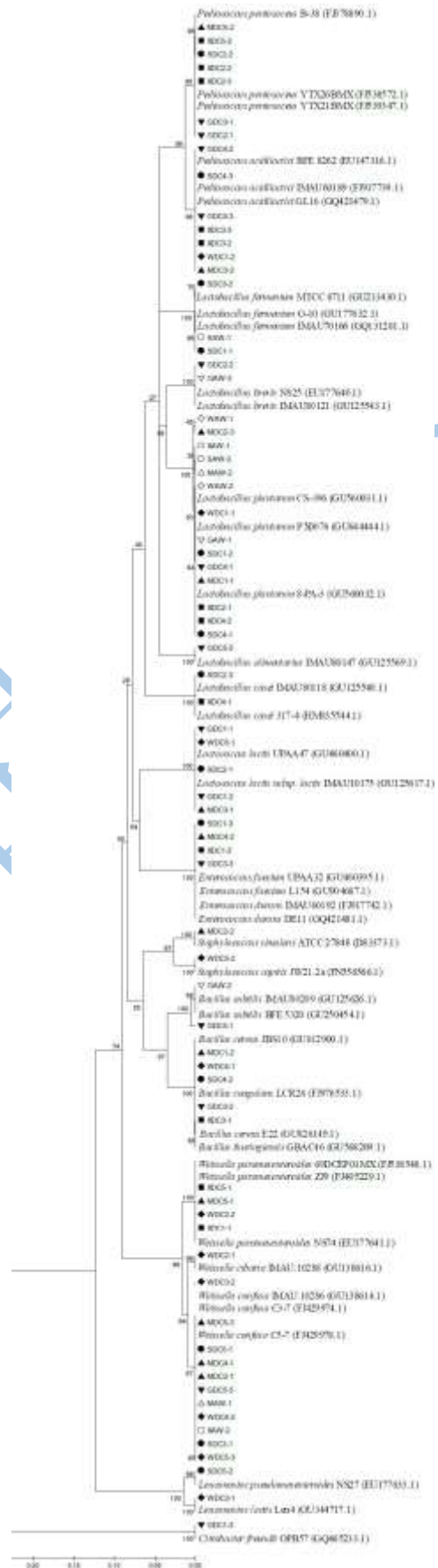


图 3 统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree



各国研究者对从本国及其它国家和地区的自然环境和传统发酵乳制品中分离出的乳酸菌进行研究,发现乳酸菌因地区和生存环境不同,其种类、数量和构成存在差异。1999年,张以芳等<sup>[5]</sup>从云南路南地区的19份乳饼制品鉴定得出德氏乳杆菌、麦芽香乳杆菌、嗜酸乳杆菌和发酵乳杆菌等4个种占60.4%,是乳饼制品中的优势种群。2005年,雷霞等<sup>[6]</sup>从内蒙古伊敏河岸牧区的61份乳及乳制品中鉴定出:植物乳杆菌和乳酸乳球菌是该地区乳及乳制品中的优势菌群。2006年,云月英等<sup>[7]</sup>在青海海西州德令哈地区采集11份酸山羊奶样品鉴定结果为:德氏乳杆菌德氏亚种和嗜热链球菌为优势菌株。2007年,刘红霞等<sup>[8]</sup>从云南省剑川县采集了13份乳饼样品鉴定结果为:乳酸球菌分离率明显高于乳酸杆菌,其中21株粪肠球菌和12株乳酸乳球菌乳亚种(分别占球菌分离株的28.38%和16.22%,为乳饼样品的优势菌株。2008年,赵蕊<sup>[9]</sup>从15份新疆伊犁牧民酸奶子样品践行鉴定,结果为:乳杆菌为新疆酸奶子中的优势菌属,以瑞士乳杆菌为最优势。

本研究从云南省石林彝族自治县的5个不同乡镇采集撒尼山羊奶乳饼25份、酸乳清样品5份,共分离到73株乳酸菌分离株,包括杆菌分离株46株和球菌分离株27株。可以看出,乳酸杆菌分离率高于乳酸球菌,这可能是由于样品尤其是酸乳清pH值偏高,对乳酸球菌的生长存活很不利,也可能是杆菌为云南省石林彝族自治县自然发酵乳制品中的优势菌,从而导致一些样品中的乳酸菌完全是乳杆菌;当然,还有可能是由于采集过程或分离过程造成菌种丢失所致。经鉴定后,分离到的46株杆菌分离株归属4个不同属中的13个种,27株球菌分离株归属5个不同属中的9个种,其中乳杆菌属中的14株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和魏斯氏菌属中的11株融合魏斯氏菌(*Weissella confusa*)分别占有所有分离株(73株)的19.18%和15.07%,是云南撒尼山羊奶乳饼及酸乳清样品中的优势菌株。鉴定出的22种乳酸菌中,干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、凝固芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、消化乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、尿肠球菌(*Enterococcus faecium*)、乳明串珠菌(*Leuconostoc lactis*)、假肠膜明串珠菌(*Leuconostoc pseudomesenteroides*)、戊糖片球菌(*Pedicoccus pentosaceus*)、头状葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)、模仿葡萄球菌(*Staphylococcus simulans*)、融合魏斯氏

菌(*Weissella confusa*)、*Weissella cibaria*、*Weissella paramesenteroides*等16种首次分离于乳饼及酸乳清样品中,蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、凝固芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、戊糖片球菌(*Pedicoccus pentosaceus*)、头状葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)、模仿葡萄球菌(*Staphylococcus simulans*)、融合魏斯氏菌(*Weissella confusa*)、*Weissella cibaria*、*Weissella paramesenteroides*等11种首次分离于乳制品样品中,这说明乳饼及酸乳清样品中乳酸菌资源既丰富又多样,同时也与我们采用大量样品进行分离有关。

乳饼、乳扇、酸马奶、酸山羊奶等传统发酵乳制品中,微生物种类和数量与其生存及分离环境密切相关。各地地理、地貌和气候等自然环境都各不相同,各牧民家庭在制作乳制品时所采用的温度、凝乳时间、制作方法以及牧民的生活习惯和挤奶的用具容器等也存在差异。并且卫生条件差,这就造成各地区不同乳制品中分离的乳酸菌种类及优势菌群存在一定的差异。

#### 4.3 乳酸菌分离株的生物多样性及其系统发育分析

本研究从30份乳饼及酸乳清样品中共分离到73株乳酸菌分离株,经鉴定,73株乳酸菌归属9个不同属中的22个不同种,其中有16种首次分离于乳饼及酸乳清样品中,有11种首次分离于乳制品样品中,由此可见,云南撒尼山羊奶乳饼及酸乳清样品中的乳酸菌既丰富又多样。

我国现有的对传统乳制品中微生物的多样性分析都是采用传统的培养法,然而许多情况下某些细菌由于其活力不够或不可在分离培养基中生长,不能被有效地分离,造成对环境微生物多样性的低估<sup>[10]</sup>。宜同时采用无需培养的分子生物学的方法,直接从样品中抽提DNA,然后采用PCR扩增,回收序列进行测序,即可知道样品中含有的微生物种类,如此可以更真实地还原这些乳制品中微生物的多样性。

在分离株中,有1株归属弗氏柠檬酸杆菌,该菌具有一定的致病性,可引起食物中毒<sup>[11]</sup>,这说明制作乳饼的某些作坊存在卫生问题或制作乳饼过程中存在一些不良因素,在今后的开发利用中要扬长避短。

以16S rRNA基因序列为基础的系统发育树(图1)显示,73株乳酸菌分离株的16S rDNA序列中,

与已知标准菌序列的同源性 $>97\%$ <sup>[12]</sup>的共有 50 个, 其对应的菌株可确切地归类至种水平, 而其余的 23 个序列与已知标准菌序列的同源性均 $\leq 97\%$ , 其所代表的分离株无法精确归类到种, 只可归类到属水平, 可能是新种, 需要做进一步的研究分析。

## 5 结论

本研究首次采用 16S rRNA 基因序列分析技术和传统理化特性研究相结合, 鉴定出分离自云南撒尼羊奶乳饼和酸乳清样品中 46 株杆菌分离株归属 4 个不同属中的 13 个种, 27 株球菌分离株归属 5 个不同属中的 9 个种; 同时绘制乳酸菌的 16S rRNA 基因序列的系统发育树并对其进行的分析。鉴定出的乳酸菌种中植物乳杆菌和融合魏斯氏菌是云南撒尼羊奶乳饼及酸乳清样品中的优势菌株, 与其他地区乳制品菌群有很大区别, 这可能与云南特有生态环境和云南撒尼民族制作乳饼方法有关。本研究为认识云南撒尼地区乳酸菌属种提供一定的依据, 对乳酸菌属种的鉴定有助于“用其利, 防其弊”, 可为今后在生活和生产中充分利用乳酸菌等微生物资源提供参考。

## 参考文献

- [1] 张晶晶. 石林成功申报世界自然遗产[OL]. 新华网云南频道, [2007-06-27]. <http://www.yn.xinhuanet.com/topic/2007/slsy/index.htm>
- Zhang J J. Successful Declaration of World Natural Heritage in Shilin [OL]. Xinhua Yunnan Channel, [2007-06-27]. <http://www.yn.xinhuanet.com/topic/2007/slsy/index.htm>
- [2] Mangell P, Thorlacius H, Syk I, et al. Lactobacillus plantarum 299v does not reduce enteric bacteria or bacterial translocation in patients undergoing colon resec
- [3] Delong E F. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-base for the identification single cells [J]. Science, 1982, (243): 1360-3
- [4] 夏雪娟, 陈芝兰, 陈宗道, 等. 16S rDNA 序列分析法快速鉴定西藏地区传统乳制品中的乳酸菌[J]. 食品科学, 2012, 11: 8
- Xia X J, Chen Z L, Chen Z D. et al. Rapid Identification of Lactic Acid Bacteria from Traditional Dairy Products in Tibet Area by 16S rDNA Sequence Analysis [J]. Food Science, 2012, 11: 8
- [5] 张以芳, 夏凤毅, 刘旭川. 乳饼制品中乳杆菌分离鉴定及其发酵性能试验[J]. 中国乳品工业, 1999, 27(6): 22-4
- Zhang Y F, Xia F Y, Liu X C. Isolation Identification and Fermented Characteristics of Lactobacillus from Dairy Cake [J]. CHINA DAIRY INDUSTRY, 1999, 27(6): 22-4
- [6] 雷霞, 周雨霞, 乌尼. 伊敏河和海拉尔河两岸牧区乳及乳制品中益生乳酸菌的分离鉴定及其体外筛选[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2005
- Lei X, Zhou Y X, Wu N. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dairy and Dairy Products in the Bank of Yimin and Hailaer River Pastoral Area and Screening of Probiotic in Vitro [D]. Nei Mongol: Neimenggu Agricultural University, 2005
- [7] 云月英, 张和平. 青海海西州传统发酵酸山羊奶的化学与微生物组成分析及乳酸菌的分离鉴定[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2006
- Yun Y Y, Zhang H P. Study on Chemical and Microbiological Compositions and Identification of Lactic acid bacteria from Natural Fermented Goat milk in Qinghai [D]. Nei Mongol: Neimenggu Agricultural University, 2006
- [8] 刘红霞, 张和平. 云南省剑川县乳饼的化学和微生物组成分析及乳酸菌的分离鉴定[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2007
- Liu H X, Zhang H P. Chemical and Microbiological Compositions and Lactic acid bacteria from milk cake of JianChuan Identification of in YunNan [D]. Nei Mongol: Neimenggu Agricultural University, 2007
- [9] 赵蕊, 霍贵成. 新疆酸奶子中乳酸菌多样性分析[J]. 山东大学学报(理学版), 2008, 43(7): 1-6
- Zhao R, Huo G C. Diversity of lactic acid bacteria isolated in sour milk from Xinjiang [J]. Journal of Shandong University(Natural Science), 2008, 43(7): 1-6
- [10] KALLIOPI Rantsiou, ROSALINDA Urso, LUCILLA Iacumin, et al. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 1977-86
- [11] 赵晓梅, 高霞, 潘玉辉, 等. 一起由弗氏柠檬酸杆菌引起的食物中毒调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(11): 2698
- Zhao X M, Gao X, Pan Y H, et al. A Survey of Food Poisoning Caused by Citrobacter Freun [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2009, 19(11): 2698
- [12] 张彦斌, 孟和毕力格. 西藏当雄地区传统发酵乳制品微生物宏基因组文库构建与乳酸菌生物多样性研究[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2009
- Zhang Y B, MENGHEBILIGE. The construction of metagenomic library from traditional fermented dairy products of Dangxiang region in Tibet and study on biodiversity of LAB [D]. Nei Mongol: Neimenggu Agricultural University, 2009