

一株青贮用高性能乳酸菌的筛选

罗红霞¹, 张俊², 王建¹, 李晓红¹, 李志敏³

(1. 北京农业职业学院, 北京 100442; 2. 江西农业大学, 南昌 330045; 3. 山西农业大学, 太谷 030801)

摘要:为筛选优良青贮饲料添加剂,从德国南部山区苜蓿制备菌粉中分离得到5株乳酸菌。通过对菌株形态学、生理生化和16S rRNA相结合方法进行鉴定,对5株外源乳酸菌和常规优势菌株7的生长曲线测定和产酸性试验,得到3株高性能乳酸菌,并对这3株乳酸菌的生物学特性进一步研究。结果显示,R1、R5为植物乳杆菌,R2、R3和R4为屎肠球菌;菌株R1、7和R5生长迅速、产酸能力较好;T>50℃时,菌株R1比R5、7耐温能力强,pH<2.5时,菌株R1的适应能力比菌株7、R5强,菌株R1比菌株R5、7抑菌能力强,外源品种R1可作为制备乳酸菌青贮饲料添加剂新的优良菌株。

关键词:青贮饲料添加剂;外源菌粉;乳酸菌;筛选

中图分类号:S816.7

文献标识码:A

文章编号:1672-352X(2017)04-0604-05

Screening of high-performance lactic acid bacteria for silage additive usage

LUO Hongxia¹, ZHANG Jun², WANG Jian¹, LI Xiaohong¹, LI Zhimin³

(1. Beijing Vocational College of Agricultural, Beijing 100442; 2. Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045;

3. Shanxi Agricultural University, Taigu 030801)

Abstract: To screen excellent microbial for silage additive usage, 5 lactic acid bacteria strains were isolated from exogenous bacteria powder. By analyzing strain morphological, physiological and biochemical characteristics and combining 16S rRNA method to identify lactic acid bacteria. By contrasting lactic acid bacteria growth curve and producing acid speed of exogenous and conventional superiority strains, It gets three high-performance lactic acid bacteria strains and compares the biological characteristics of three strains bacteria. Results show that R1 and R5 are lactobacillus plantarum; R2, R3 and R4 are Enterococcus faecium; Strain R1, 7, R5 grows fast and the ability of producing acid is better; T > 50℃, The heat-resistant ability of R1 is better than R5 and 7, pH < 2.5, The adaptive capacity of R1 is better than R5 and 7. The bacteriostatic ability of R1 is better than others, Exogenous varieties R5 as an excellent Lactic acid bacteria for silage additive usage.

Key words: silage additives; exogenous bacteria powder; lactic acid bacteria; screening

乳酸菌是一类能利用糖发酵产生乳酸的细菌统称,它与工业、农业、食品和医药等有重要联系。文献报道,一些欧盟国家、美国及日本等研究学者在青贮饲料方面对乳酸菌应用方面开展大量深入的研究^[1],如性状优良乳酸菌的筛选、青贮发酵剂的研究、乳酸菌发酵对青贮饲料品质的影响、发酵的青贮饲料对动物采食量的影响以及乳酸菌对青贮饲料二次发酵抑制作用等。生产优质的商品化饲料添加剂关键在于使用优良菌种,国外已经专门成立了乳酸菌研究中心,对选育优良乳酸菌的功能要求已

经基本形成标准^[2]。而我国起步较晚,将乳酸菌应用于青贮饲料添加剂的技术还十分薄弱,在这方面的报道还不多见。我国学者对国内常规优势乳酸菌性能方面的研究较多,但很少研究外源乳酸菌的特性,因此迫切需要加强对外来品种研究,通过国内常规优势乳酸菌与外源优势乳酸菌的特性对比,来选育出更优质的乳酸菌。

本试验以从外源菌粉中筛选出的优势乳酸菌与从常规青贮饲料中筛选出的7号优良乳酸菌为研究目标,在生长速率、产酸速率、耐温、耐低pH值、

收稿日期: 2016-01-11

基金项目: 北京农业职业学院技术研发与示范推广基金《优良乳酸菌特性分析筛选及微胶囊化研究》(XY-YF-17-10)资助。

作者简介: 罗红霞, 博士, 教授。E-mail: hongxiajun@163.com

生长试验和抑菌能力方面进行对比,旨在筛选出应用于饲料行业高品质的乳酸菌新品种,为青贮饲料添加剂的研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 R1、R2、R3、R4 和 R5 来自德国南部山区优良苜蓿;7号乳酸菌^[3]来自河北省廊坊市固安县近郊青贮饲料,在实验室前期试验中获得。

1.1.2 指示菌来源 大肠埃希氏菌(代号为 10899)、金黄色葡萄球菌(代号为 20235)来源于中国微生物保藏中心(CICC);沙门氏菌来(SAL)源于中国农业大学。

1.1.3 各种培养基和试剂 革兰氏试剂、明胶液化试剂、硫化氢试验试剂、过氧化氢试剂和葡萄糖产酸产气试剂均按照文献^[4]配置。

1.2 方法

1.2.1 菌粉制备工艺^[5-7] 在本试验前期研究基础上,根据乳酸菌的生长和产酸情况,初步从德国南部山区优良苜蓿提取出未知 5 株乳酸菌,在无菌条件下,按体积比 1:1:1:1:1 的比例混合 3 mL 菌悬液倒入已灭菌的一次性培养皿,加入 3 倍体积的保护剂^[8],摇匀。在-40℃预冻 5 h,使菌液均匀冷冻。然后开启真空冷冻干燥机在-35℃冷冻干燥 30 h,得到干燥菌粉,保存备用。

1.2.2 细菌分离 (1)样品制备。将菌粉装于密封袋中,放入冰盒,于实验室 4℃冰箱保存。

(2)乳酸菌的分离。取 1 g 的样品与 30 mL 无菌水混匀,用无菌水稀释到 10^{-1} ~ 10^{-9} ,取 10^{-8} 和 10^{-9} 2 个稀释梯度,利用平板划线法接种 MRS 固体培养基平板上,置于 37℃恒温培养箱中倒置培养 48 h。进行革兰氏染色、镜检^[9]。凡革兰氏阳性的菌株继续分离纯化培养,纯化后的菌株接种到 MRS 固体培养基中,于 37℃恒温培养箱中静置培养 24 h,至少活化 2 代,菌种保存在 MRS 肉汤(其中加入 20%的甘油),-80℃保存^[10-11]。

1.2.3 乳酸菌分离株的鉴定 (1)乳酸菌菌属鉴定。将革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性菌株进行硫化氢试验、明胶液化试验、葡萄糖产酸产气试验和盐浓度试验(4%NaCl 和 6.5%NaCl),温度试验(20℃和 45℃)和酸度试验(pH 4.5 和 pH 9.6)^[12-14],来区分杆菌和球菌。

(2)乳酸菌菌种鉴定。根据文献^[4],乳酸菌种鉴定主要通过对其碳水化合物发酵产酸试验区分。

(3)乳酸菌 16S rRNA 基因序列测定。根据国

际上通用乳酸菌引物序列设计引物(F: 5'-ACAAG CCGTAGAGCATG-3', R: 5'-TAGCCCAGGT CATA AGG-3'),按细菌 DNA 提取试剂盒操作说明进行乳酸菌 DNA 的提取,PCR 反应体系为: 10×ES *Taq* PCR Buffer 5 μL; dNTP Mix, 2.5 mmol·L⁻¹ 4 μL; 正向引物(Forward primer 10 μmol·L⁻¹) 2 μL; 反向引物(Reverse primer 10 μmol·L⁻¹) 2 μL; 样液 DNA 0.5 μL; ES *Taq* DNA Polymerase 0.25 μL; 最后加 RNase-Free Water 到 50 μL。PCR 反应条件: 94℃预变性, 2 min; 94℃变性 30 s; 55~65℃退火 30 s; 72℃延伸 30 s, 进行 30 个循环; 最后 72℃延伸 2 min^[15-16]。最后将提取 DNA 委托北京三博公司测序。测得的序列通过 NCBI 上的 BLAST 程序在 GenBank 数据库中进行比对^[17]。

1.2.4 常规青贮饲料中优良 7 号菌株 7 号菌株,是本实验室前期从河北省廊坊市固安县近郊常规青贮饲料中筛选出来的,此菌株特性研究参见文献^[3]。

1.2.5 高性能乳酸菌的初筛 (1)生长速率测定。将乳酸菌活化好后按 3%的接种量接种于 MRS 液体培养基中,放置于 37℃恒温培养箱静置培养 14 h,每隔 2 h 测定不同菌株发酵液的 OD_{600} 值,培养基为空白对照,以时间为横坐标,OD 值为纵坐标,绘制不同乳酸菌的生长速率曲线。

(2)产酸性测定。将乳酸菌活化好后按 3%的接种量接种于 MRS 液体培养基中,放置于 37℃,培养 14 h,每隔 2 h 测定不同菌株发酵液 pH 值^[18],以时间为横坐标,pH 值为纵坐标,绘制产酸速率曲线。

1.2.6 高性能乳酸菌复筛 (1)耐温性试验。将活化好乳酸菌按 6%的接种量接种于 MRS 液体培养基中,分别置于 40℃、50℃、55℃、60℃和 80℃的恒温培养箱静置培养 24 h,每组设 3 个重复,以温度为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标制图。

(2)耐低 pH 值生长试验。将活化好乳酸菌按 6%的接种量分别接种于 pH2.0、2.5、3.0、3.5 和 4.5 的 MRS 液体培养基中,每组设 3 个重复,37℃,恒温培养箱静置培养 24 h,以 pH 为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标制图。

(3)抑菌能力比较。用 MRS 培养基活化乳酸菌 R1、R5 和 7 号菌株,普通营养琼脂活化沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌,活化好后,将指示菌菌液浓度稀释到 10^{-3} ,分别取 200 μL 涂布于相应的固体培养基,将涂布的平板在超净工作台中吹至培养皿表面无水珠流动。用无菌镊子取出灭过菌的牛津杯轻轻放置在接种过指示菌的培养皿中,然后放入冰箱 30 min 后取出。在无菌超净工作台中,

取 200 μL 的供试菌株发酵上清液注入牛津杯中^[19]。分别将平板放入适宜的温度中培养, 细菌培养 2 d, 最后根据抑菌圈的大小筛选出优势菌株。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌生理生化试验鉴定

从外源菌粉中分离出 5 株乳酸菌, 分别编号为 R1、R2、R3、R4 和 R5。5 株分离菌株的属种鉴定结果如表 1 所示, 菌株 R1、R2、R3、R4 和 R5 为革兰氏阳性菌, 镜检 R1、R5 菌株形态为杆状, R2、R3 和 R4 为球状。5 株乳酸菌的过氧化氢试验, 硫化氢试验、明胶液化试验结果均为阴性, 葡萄糖产酸试验结果为阳性、产气试验结果为阴性。R1 和 R5 号乳酸菌株能发酵水杨苷、纤维二糖、蔗糖、棉籽糖、菊糖、七叶苷、甘露醇、麦芽糖和山梨醇, R2、R3 和 R4 菌株能发酵水杨苷、纤维二糖、蔗糖、菊糖、七叶苷、甘露醇和麦芽糖, 但不能发酵棉籽糖和山梨醇。菌株 R1、R3 和 R5 能在 20 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、4%和 6.5%NaCl, pH 4.5 和 pH 9.6 的培养液中生长, 菌株 R2、R4 能在 20 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、4%和 6.5%NaCl, pH9.6 条件下生长, 但不能在 pH 4.5 条件下生长。根据《伯杰细菌鉴定手册》^[20], 初步鉴定 R1、R5 号菌株为植物乳杆菌, R2、R3 和 R4 为屎肠球菌。

2.2 5 株乳酸菌 16S rRNA 序列分析

分别提取菌株 R1、R2、R3、R4 和 R5 的 DNA, 然后经 PCR 扩增对获得的 16S rRNA 基因序列进行琼脂糖凝胶电泳, 在 1 500 bp 处清晰看到条带如图 1。测序结果在 GenBank 数据库中进行 16S rRNA 基因同源性序列比对, 结果显示: 菌株 R1 和菌株 R5 与参考标准菌株的 16S rRNA 基因序列相似性均达 99%, 为植物乳杆菌; 菌株 R2、R3 和 R4 与参考标准菌株的 16S rRNA 基因序列相似性达 99%, 为屎肠球菌, 进一步验证传统方法的准确性, 结果见表 2。

2.3 高性能乳酸菌初选

2.3.1 生长速率测定 由图 2 可知, 5 株乳酸菌在 0~2 h 时处于适应期, 生长比较慢; 2~8 h 时处于对数增长期, 生长比较快; 8~10 h 时处于生长稳定期, 这时的乳酸菌几乎不再生长, OD_{600} 值变化小, 从图中可以看出乳酸菌没有明显的迟滞期, 说明乳酸菌在 MRS 液体培养基中的生长比较旺盛。菌株 R1、R5 和 7 生长速度较快, 菌株 R2、R3 的生长较缓慢, 对数期不明显, 14 h 后乳酸菌 R1、R2、R3、R5 和 7 的菌液 OD_{600} 值分别达到 1.707、0.566、0.787、1.542 和 1.585, 利用 SPSS 进行多重比较, 结果如表 3 所示, 培养 14 h 后, R1 菌株与起始值相比 OD_{600}

增长了 1.675, R5 和 7 号菌株分别增长了 1.509 和 1.552, 且显著高于 R2 和 R3 号 2 株菌 ($P<0.05$), 因此得出菌株 R1、R5 和 7 具有青贮潜力。

表 1 乳酸菌生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical identification of lactic acid bacteria

项目 Item	R1	R2	R3	R4	R5
形状 Shape	杆状	球形	球形	球形	杆状
革兰氏染色 Gram stain	+	+	+	+	+
过氧化氢	-	-	-	-	-
Hydrogen peroxide	-	-	-	-	-
硫化氢	-	-	-	-	-
Hydrogen sulfide test	-	-	-	-	-
明胶液化	-	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	-	-	-	-	-
葡萄糖产酸	+	+	+	+	+
Glucose produced acid	+	+	+	+	+
葡萄糖产气	-	-	-	-	-
Glucose produced gas	-	-	-	-	-
水杨苷 Salicin	+	+	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	+	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+	+
棉籽糖 Raffinose	+	-	-	-	+
菊糖 Synanthrin	+	+	+	+	+
七叶苷 Aesculin	+	+	+	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+
山梨醇 Sorbitol	+	-	-	-	+
4%NaCl	+	+	+	+	+
6.5%NaCl	+	+	+	+	+
20 $^{\circ}\text{C}$	+	+	+	+	+
45 $^{\circ}\text{C}$	+	+	+	+	+
PH4.5	+	+	+	+	+
PH9.6	+	-	+	-	+

注: “+”表示生长, “-”表示不生长。

Note: “+” means bacterium growth, “-” means no bacterium growth.

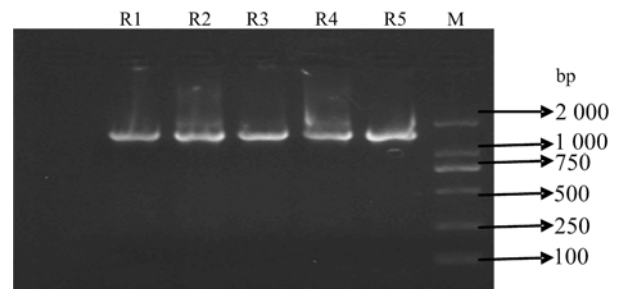


图 1 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis

2.3.2 产酸性测定 由图 3 可知, 5 株乳酸菌在 2~6 h 时产酸速率最快, 6~10 h 趋于平缓, 8~14 h 逐渐平稳, 5 株乳酸菌经培养 14 h 后 pH 值分别为 3.75、4.65、4.20、3.91 和 3.89。产酸速率是筛选良好乳酸

菌重要特征之一, 不同菌株间差异较大, 在青贮饲料制备过程中 pH 快速和大幅度下降可抑制青贮原料中有害微生物生长, 从而提高青贮饲料品质, 利用 SPSS 进行多重比较, 结果如表 4 所示, 培养 14 h

后, R 1、R 5 和 7 号菌株的产酸速率最快, 与起始 pH 值相比分别下降了 2.03、1.85 和 1.86, 且 R1、R5 和 7 号 3 株菌显著高于 R2 和 R3 号 2 株菌 ($P < 0.05$), 因此菌株 R1、R5 和 7 可以用于青贮饲料中。

表 2 分离乳酸菌 16S rRNA 序列在 GenBank 数据库比对结果
Table 2 Results of 16SrRNA sequence in GenBank database

菌株 Bacterial strain	参照序列 Consensus sequence	同源性 Homology	BLAST 结果 Result of BLAST
R1	GU253892	99%	<i>Lactobacillus plantarum</i>
R2	KT278819.1	99%	<i>Enterococcus faecium</i>
R3	JN560937.1	99%	<i>Enterococcus faecium</i>
R4	KT278819.1	99%	<i>Enterococcus faecium</i>
R5	AB831182.1	99%	<i>Lactobacillus plantarum</i>

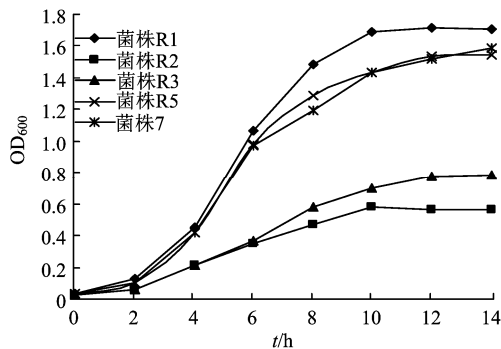


图 2 乳酸菌生长速率曲线

Figure 2 The growth rate curve of lactic acid bacteria

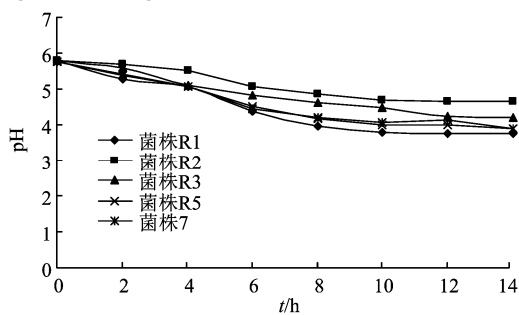


图 3 乳酸菌产酸速率曲线

Figure 3 The acid production rate curve of lactic acid bacteria produce

表 3 生长速率数据分析

Table 3 Data analysis of growth rates

菌株 Bacterial strain	培养时间/h Cultivation time		
	2	8	14
R 1	0.128 ^c	1.482 ^c	1.707 ^c
R 2	0.062 ^a	0.470 ^a	0.566 ^a
R 3	0.058 ^a	0.583 ^b	0.787 ^b
R 5	0.103 ^b	1.291 ^d	1.542 ^c
7	0.101 ^b	1.191 ^c	1.585 ^d

注: 同列字母相同差异不显著 ($P > 0.05$), 同行字母不同差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Note: Values with the same letters within the same line have no significant difference ($P > 0.05$), while the same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). The same below.

表 4 产酸速率数据分析

Table 4 Data analysis of acid-producing rates by different strains

菌株 Bacterial strain	培养时间/h Cultivation time		
	2	8	14
R 1	5.26 ^a	3.98 ^a	3.75 ^a
R 2	5.70 ^d	4.85 ^d	4.65 ^d
R 3	5.57 ^c	4.61 ^c	4.20 ^c
R 5	5.43 ^b	4.18 ^b	3.91 ^b
7	5.38 ^b	4.20 ^b	3.89 ^b

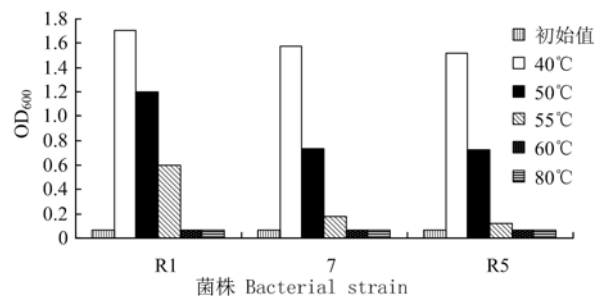


图 4 乳酸菌耐温试验

Figure 4 Heat resistance test of lactic acid bacteria

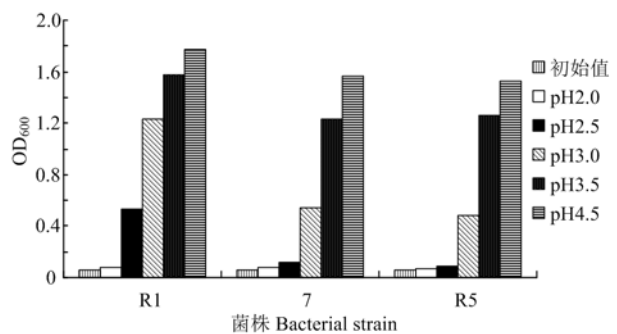


图 5 乳酸菌耐低 pH 值生长试验

Figure 5 The lactic acid bacteria growth experiments under different pH values

2.4 高性能乳酸菌复筛

2.4.1 耐温性试验 由图 4 可知, 5 株乳酸菌在培养温度 60°C 以上基本不再生长, 菌株 R1 在培养温度 55°C 时, OD_{600} 值较初始值高, 说明该菌株具有

较强的耐高温能力,菌株 7、R5 对温度较敏感,在培养温度为 55℃是基本不再生长。结果显示,3 株高性能乳酸菌中,菌株 R1 耐温能力最强。

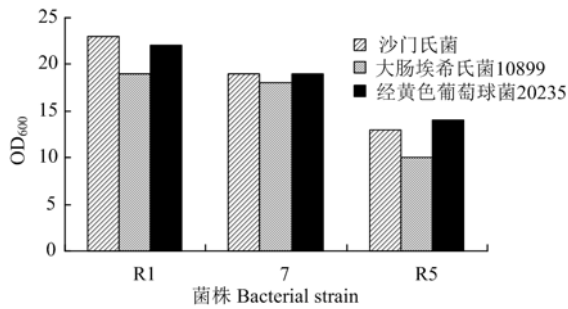


图 6 乳酸菌抑菌能力比较

Figure 6 Comparison of bacteriostatic ability of different strains

2.4.2 耐低 pH 值生长试验 由图 5 可知,在低 pH 值环境中,菌株 R1 在 pH 2.5 时,OD₆₀₀ 值较初始值高,说明该菌株具有较强的耐低 pH 值能力,但菌株 7、R5 在 pH 2.5 时基本不再生长。结果显示,3 株高性能乳酸菌中,菌株 R1 耐低 pH 值能力最强。

2.4.3 抑菌能力比较 大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌是较为常见的病原细菌,可以引起青贮饲料的腐败变质。由图 6 可知,菌株 R1、7 比菌株 R5 抑菌能力强,对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌都有较强的抑制作用,抑菌圈直径在 16~25 mm 之间;其中菌株 R1 的抑菌圈直径范围比菌株 7 直径范围广。结果显示:3 株高性能乳酸菌中,外源菌株 R1 抑菌能力最强。

3 结论

从德国南部山区苜蓿制备菌粉分离出 5 株乳酸菌,并通过传统的形态学、生理生化特征分析和 16S rRNA 进行双重鉴定^[21]。鉴定结果显示:R1 和 R5 为植物乳杆菌;R2、R3 和 R4 为屎肠球菌。

对鉴定出外源乳酸菌和从常规青贮饲料提取优势 7 号菌株绘制生长曲线和产酸曲线,初筛结果表明:R1、R5 和 7 号菌株是 3 株生长快、产酸高,是具有青贮潜力的菌株。

进一步研究结果显示:T(温度)>60℃3 株菌基本不生长,但在 55℃时 R1 的 OD₆₀₀ 值比初始值高,菌株 7、R5 的 OD₆₀₀ 值几乎等于初始值,菌株 R1 耐温能力比菌株 7、R5 强;pH<2.5 的低酸性环境下,菌株 R1 的适应能力比菌株 7、R5 强。3 株菌抑菌能力结果证明了菌株 R1 对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌效果最强,抑菌圈直径都在 18~25 mm 之间。综合以上研究得

到一株高性能乳酸菌 R1,且该菌株比从常规青贮饲料分离优势菌株 7 的生物特性更好。

筛选优良的乳酸菌是生产高品质青贮饲料的重要保证,本研究可为复配饲料添加剂的研发提供优良的菌株和科学的理论基础。

参考文献:

- [1] 温雅俐,高民.青贮饲料中乳酸菌代谢及其青贮品质影响研究进展[J].畜牧与饲料科学,2010,31(9):15-17.
- [2] 阿布都克尤木·麦麦提,热娜·阿布都米吉提,乌斯满·依米提.小麦秸秆发酵液中优质乳酸菌的分离、纯化与鉴定[J].安徽农业科学,2011,39(35):21824-21828.
- [3] 于佳弘.优良乳酸菌的分离鉴定及复合菌粉制备工艺的研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2015.
- [4] 凌代文.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999.
- [5] 王茜,代海兵,桂艺方.嗜酸乳杆菌冻干菌粉制备[J].牡丹江医学院学报,2012,33(1):16-18.
- [6] CARVALHO A S, SILVA J, HO P, et al. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants[J]. Biotechnol Lett, 2002, 24(19): 1587-1591.
- [7] CARVALHO A S, SILVA J, HO P, et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria[J]. Int Dairy J, 2004, 14(10): 835-847.
- [8] 陈贺佳,牟光庆.混合乳酸菌复合冻干保护剂的研究[J].食品研究与开发,2013,34(18):133-135.
- [9] 云月英,王文龙,王雅娟.耐酸乳酸菌的筛选及初步鉴定[J].江苏农业科学,2013,41(1):256-259.
- [10] 张慧杰,玉柱,王林,等.青贮饲料中乳酸菌的分离鉴定及优良菌株筛选[J].草地学报,2011,19(1):137-141.
- [11] 刘飞,杨丽杰,侯俊财,等.青贮饲料中优良乳酸菌的分离鉴定[J].江西饲料,2007(1):22-25.
- [12] 王莉,刘秀花,刘燕雅.乳酸菌的筛选及生物学特性的研究[J].商丘师范学院学报,2008,24(12):98-101.
- [13] YAN P, ZHANG Y H, MAIREMUNISA A, et al. Isolation and identification of high-quality lactic acid bacteria in forage corn[J]. Anim Husb Feed Sci, 2011, 3(1): 7-10.
- [14] GU R X, YANG Z Q, LI Z H, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China[J]. Anaerobe, 2008, 14(6): 313-317.
- [15] 张洁,徐桂花,尤丽琴.16S rDNA 序列分析法鉴定乳酸菌[J].农产品加工(创新版),2009(4):47-49.
- [16] 张彦斌,方芳,李莉,等.内蒙古传统乳制品中产细菌素乳酸菌的筛选及鉴定[J].中国乳品工业,2009,37(8):9-12.
- [17] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [18] 葛红莲,郭翠红,张军令.两株乳酸菌的分离鉴定及产酸性能的研究[J].周口师范学院学报,2009,26(2):89-91.
- [19] 刘冬梅,李理,杨晓泉,等.用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J].食品研究与开发,2006,27(3):110-111.
- [20] 霍尔特 J G.伯杰细菌鉴定手册[M].刘复今,等译.济南:山东大学出版社,1988.
- [21] LAU S K, WOO P C, WOO G K, et al. Catheter-related *Microbacterium* bacteremia identified by 16S rRNA gene sequencing[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(7): 2681-2685.