

发酵乳中动物双歧杆菌乳亚种分离及鉴定

赵婷¹ 韩辉² 刘波¹ 李辉¹ 程池^{1*}

(1. 中国食品发酵工业研究院 中国工业微生物菌种保藏管理中心 北京 100027)

(2. 科汉森(天津)食品添加剂有限公司北京分公司 北京 100026)

摘要: 采用改良MRS培养基从蒙牛冠益乳酸奶中选择性分离得到2种乳酸菌, 表型特征检测初步确定目标菌株BB-12, 该菌株符合双歧杆菌属特征描述。通过Biolog微生物自动鉴定系统鉴定、16S rDNA序列分析、*atpD*基因序列分析, 多相鉴定表明: 菌株BB-12为动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*)。系统发育学分析表明: *atpD*基因序列比16S rDNA序列在动物双歧杆菌亚种水平鉴定上有更好的分辨率。

关键词: 动物双歧杆菌, *atpD*基因, 改良MRS培养基, 多相鉴定, Biolog

Isolation and Identification of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in Fermented Milk Products

ZHAO Ting¹ HAN Hui² LIU Bo¹ LI Hui¹ CHENG Chi^{1*}

(1. China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, China Center of Industrial Culture Collection, Beijing 100027, China)

(2. Chr. Hansen (Tianjin) Food Ingredient Co. Ltd. Beijing Branch, Beijing 100026, China)

Abstract: Two strains were selectively isolated from the sample of Mengniu fermented milk product on modified MRS medium. Strain BB-12 was selected by morphology observation, it was consistent with the characteristics of *Bifidobacterium* sp.. On the basis of polyphasic approach: morphology, physiology and molecular properties, it was evident that the strain BB-12 belonged to *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Analysis of 16S rDNA sequences (GenBank accession No. GU116483) and *atpD* gene sequences (GenBank accession No. GU116482) revealed that the latter had clear separation of two subspecies while the former was not possible since their sequences displayed at least 99.1% homology.

Keywords: *Bifidobacterium animalis*, *atpD* gene, Modified MRS, Polyphasic approach, Biolog

双歧杆菌(*Bifidobacterium* sp.)是一类常用于食品添加的益生菌, 其中的一些种对胃酸和胆汁盐有较好的耐受性, 可有效补充肠道益生菌群, 具有维护肠道生态平衡和促进人体健康的作用, 广泛应用于益生菌乳产品、食品添加剂及医药行业中^[1]。目

前市场上含双歧杆菌的益生菌产品, 大多由多种益生菌组成, 并以双歧杆菌和乳酸菌联合使用为多, 动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)和乳双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)是其中两个重要的种, 与动物双歧杆菌比较, 乳双歧杆菌显示了更好的

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2007BAK36B06); 国家自然科学基金资源基础条件平台项目(No. 2005DKA21204)

*通讯作者: Tel: 86-10-64616613; 信箱: cheng100027@163.com

收稿日期: 2009-10-20; 接受日期: 2009-12-09

氧耐受性^[2], 保证其在商业乳产品中可以达到很高的菌数。

国家食品药品监督管理局为进一步规范用于生产普通食品和婴幼儿配方食品的菌种, 确保人体健康和食品质量安全, 在 2009 年 3 月卫生部监督局发布关于公开征求《可用于生产普通食品的菌种名单》和《可用于婴幼儿配方食品的菌种名单》意见的函(卫监督食便函〔2009〕74 号)中把动物双歧杆菌(*B. animalis*)和乳双歧杆菌(*B. lactis*)分别列入《可用于生产普通食品的菌种名单》和《可用于婴幼儿配方食品中的菌种名单》中^[3]。为了保证此类产品的质量及正确标识, 明确工业用微生物菌株的分类地位并快速准确检测其含量显得非常重要。

自 Meile 等^[2]对乳双歧杆菌进行了首次描述以来, 对于该菌分类地位的争论从未停止。一些研究显示了其与动物双歧杆菌的密切相关性, 曾将其描述为动物双歧杆菌^[4]。基于形态学特征、16S rDNA 序列分析和 DNA-DNA 杂交^[5], Cai 提议乳双歧杆菌应该被认为是动物双歧杆菌的同物异名。但是, 新的基因证据, 如 Ventura 和 Zink^[6]、Zhu 等^[7]、Liesbeth Masco 等^[8]所报道的, 认为乳双歧杆菌和动物双歧杆菌应该在亚种水平被划分为两个分类单元, 明确了其分类地位, 将动物双歧杆菌重新分类为动物双歧杆菌动物亚种, 将乳双歧杆菌重新分类为动物双歧杆菌乳亚种。目前, 国内对种以下分类单元的鉴定方法研究很少。

本文通过参阅国内外有关文献及双歧杆菌、乳酸菌计数的标准^[9-14], 认为科汉森(天津)食品添加剂有限公司企业标准^[14]是一种简单易行快速准确的双歧杆菌活菌计数方法, 参考该方法对市售蒙牛冠益乳酸奶中双歧杆菌进行了选择性分离, 并对目标菌株在亚种水平进行了多相鉴定, 旨在为食品行业中特定微生物的快速检出计数及明确标识提供技术依据。

1 材料

1.1 样品与菌株

供试样品: 蒙牛冠益乳酸奶(250 g/杯), 生产批号 H20080605 [其中含有双歧杆菌 BB-12 (*Bifidobacterium* BB-12[®])、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、

保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*) 4 种乳酸菌]。

1.2 培养基及试剂

MRS 琼脂培养基: Difco 288210;

双氯青霉素钠盐溶液(10 g/L): Sigma D-9016, 0.45 μm 孔径微孔滤膜过滤除菌;

LiCl 溶液(0.1 g/mL): Merck No. 5679, 0.45 μm 孔径微孔滤膜过滤除菌;

盐酸半胱氨酸溶液(100 g/L): Merck No. 2839;

改良 MRS 琼脂培养基: 每升 MRS 琼脂培养基(Difco 288210)中加入 5 mL 双氯青霉素钠盐溶液, 加入 10 mL LiCl 溶液, 加入 5 mL 盐酸半胱氨酸溶液;

厌氧培养产气剂购自日本三菱 MGC;

Taq DNA 聚合酶、dNTP、DL 2000 Marker 购自天根生化科技有限公司;

GoldView 购自北京塞百盛基因技术有限公司;

溶菌酶购自 Sigma 公司;

蛋白酶 K 购自 Merck 公司;

其他化学药品均为进口分装或国产分析纯。

2 方法

2.1 菌株的分离纯化^[10]

称取蒙牛冠益乳酸奶(250 g/杯) 5 g 至 45 mL 0.85%灭菌生理盐水中(加适量玻璃珠)作为母液, 振荡 10 min 充分混匀, 用无菌操作方法用 1 mL 灭菌吸管吸取 1 mL 菌液做 10 倍梯度稀释, 选择 3 个合适的稀释度, 每一稀释度取 0.1 mL 滴于预先倾注好的改良 MRS 培养基平板表面, 每个稀释度同时做 2 份, 用灭菌涂布棒均匀涂布, 并同时做稀释液的空白对照。平板倒置于厌氧培养罐中 37°C 培养 72 h ± 3 h。进行菌落形态和细胞形态观察。

2.2 Biolog 全自动微生物鉴定系统对菌种的鉴定^[15]

将菌株接入厌氧菌培养基 Biolog Universal Anaersal (BUA) + 5%羊血(B), 37°C 培养 24 h。接种液选用厌氧菌鉴定微平板(AN-IF), 接种液浊度 65%, 接种量 AN/100 μL, 37°C 培养 24 h。

将厌氧菌鉴定微平板(AN-IF)放入 Biolog 全自动微生物鉴定仪, 观察板中 96 孔的颜色变化, 使用 Biolog Micro Station System 4.2 软件分析, 机器读板

结果直接与数据库比较, 记录结果。

2.3 *atpD* 基因及 16S rDNA 序列鉴定

2.3.1 基因组 DNA 提取: 基因组 DNA 提取方法参照文献[16]。

2.3.2 *atpD* 基因和 16S rDNA 序列的扩增及检测: 以菌株 BB-12 基因组 DNA 为模板, 以 *atp-1* 和 *atp-2* 为引物, 对 *atpD* 基因进行扩增。引物序列为 *atp-1*: (5'-CACCTCGAGGTCGAAC-3'), *atp-2*: (5'-CTGCATCTTGTGCCACTTC-3')^[8]。PCR 混合液反应体系 50 μ L 包含 20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 200 μ mol/L dNTP, 50 pmol 引物, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增反应程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。以菌株 BB-12 基因组 DNA 为模板, 以 27F 和 1541R 为引物, 对 16S rDNA 序列进行扩增。引物序列为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1541R: 5'-AAGGAGGTGATCCACCC-3'^[16]。PCR 反应体系除引物不同外, 其他与 *atpD* 基因 PCR 反应体系相同。PCR 扩增反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分离检测, 染料为 Goldview。

2.3.3 序列测定、分析及系统发育树的构建: 纯化后的 PCR 产物用 ABI3700 基因测序仪测序。测序由北京宝杰罗生物技术有限公司完成。测序结果用 Chromas 软件参照正反序列图谱人工校对。由 GenBank 获得乳杆菌属相关菌株 *atpD* 基因序列, 以 Clustal X^[8] 进行序列比对后, 用 MEGA 3.1 的 Neighbor-joining 法构建系统发育树^[8], 并进行 1000 次 Bootstraps 检验。对 16S rDNA 序列进行同样操作, 构建系统发育树。

3 结果与分析

3.1 菌株的分离纯化

在改良 MRS 培养基平板中有两种菌落生长, 挑取典型菌落, 进一步分离菌株, 分别编号为 1[#]、2[#], 观察生长菌落特征及细胞形态(见图 1、2、3 及表 1), 菌株 1[#]、2[#]通过菌落形态特征及细胞形态特征均可区分, 初步判断菌株 1[#]为目标菌株 BB-12, 该菌株形态学符合双歧杆菌属特征描述。

3.2 Biolog 全自动微生物鉴定系统对菌种的鉴定

Biolog 全自动微生物鉴定系统给出的结果菌株

BB-12 为双歧杆菌属(*Bifidobacterium* sp.), 为属水平鉴定结果。

3.3 基因组 DNA 提取、PCR 扩增与序列测定

提取的基因组 DNA 片段大于 23 kb, 满足 PCR 扩增的需求。用引物对 *atp-1* 和 *atp-2* 扩增 *atpD* 基因片段, 目的条带约为 1.1 kb(图 4)。用引物对 27F 和

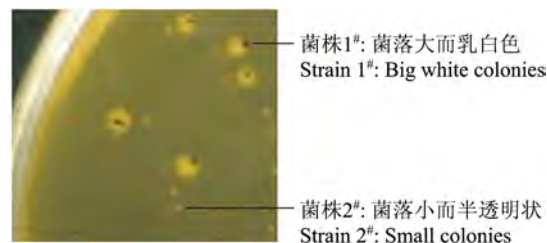


图 1 厌氧 37 $^{\circ}$ C 培养 3 d 菌落形态

Fig.1 Colony morphology on anaerobic 37 $^{\circ}$ C, 3 d

注: 菌株 1[#]和菌株 2[#]在添加了双氯青霉素、氯化锂和半胱氨酸盐酸盐的 MRS 培养基上, 菌落大而乳白色的为双歧杆菌, 菌落小而半透明状的为链球菌。

Note: Strain 1[#] and Strain 2[#] on MRS with dicloxacillin, lithium chloride and cystein hydrochloride. Big, white colonies are *Bifidobacterium* sp., small colonies are *Streptococcus* sp..



图 2 菌株 1[#]的细胞形态($\times 1000$)

Fig.2 Micromorphology of strain 1[#] ($\times 1000$)

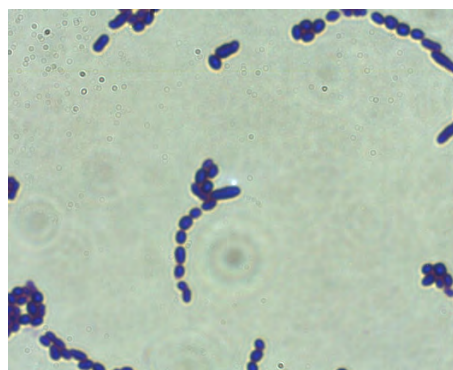


图 3 菌株 2[#]的细胞形态($\times 1000$)

Fig.3 Micromorphology of strain 2[#] ($\times 1000$)

1541R 扩增 16S rDNA 序列, 目的条带约为 1.5 kb (图 5)。atpD 基因序列在 GenBank 登录号为 GU116482, 16S rDNA 序列在 GenBank 登录号为 GU116483。

表 1 分离菌株在改良 MRS 琼脂培养基的菌落特征及细胞形态
Table 1 Morphology of strain 1[#] and 2[#] on modified MRS agar

菌株编号 Strain number	菌落形态 Colony morphology	细胞形态 Micromorphology
1 [#]	乳白色, 表面光滑, 中央隆起, 边缘整齐, 菌落直径约 3 mm。	革兰氏阳性, 菌体呈棒状, Y 字形, 顶端膨大, (0.63–1.25) μm × (3.12–6.25) μm。
2 [#]	无色, 表面光滑, 边缘整齐, 菌落直径约 1 mm。	革兰氏阳性, 菌体呈球状, 形成长链, 直径约 1 μm。

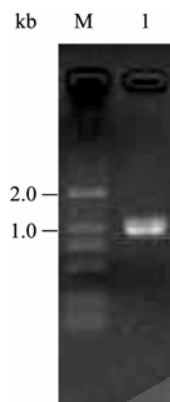


图 4 菌株 BB-12 atpD 基因 PCR 扩增结果
Fig. 4 atpD gene PCR amplification result of strain BB-12
注: M: DL2000 marker; 1: 菌株 BB-12.
Note: M: DL2000 marker; 1: Strain BB-12.

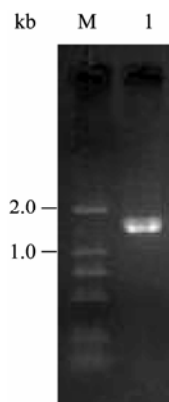


图 5 菌株 BB-12 16S rDNA 序列 PCR 扩增结果
Fig. 5 16S rDNA sequences PCR amplification result of strain BB-12
注: M: DL2000 marker; 1: 菌株 BB-12.
Note: M: DL2000 marker; 1: Strain BB-12.

3.4 菌株系统发育树的构建和系统发育分析

以 *Escherichia coli* ATCC 11775^T 为外群, 构建菌株 BB-12 16S rDNA 序列系统发育树(图 6)。菌株 BB-12 与动物双歧杆菌的 2 个亚种 *B. animalis* subsp. *lactis* DSM 10140^T、*B. animalis* subsp. *animalis* JCM 1190^T 聚类在分类距离最近的一个分支上, Bootstrap 支持率为 100%, 菌株 BB-12 与 *B. animalis* subsp. *lactis* DSM 10140^T、*B. animalis* subsp. *animalis* JCM 1190^T 序列同源性均在 99.1% 以上, 与双歧杆菌属内其他种同源性均低于 97%, 鉴定结论为动物双歧杆菌(*B. animalis*), 在种水平上有很好的分辨率。

以一组乳杆菌 *L. rhamnosus* DSM 20021、*L. gasseri* DSM 20243、*L. amylolyticus* DSM 11614、*L. acidophilus* ATCC 4356、*L. helveticus* NCDO 2712 为外群, 构建菌株 BB-12 atpD 基因系统发育树(图 7)。菌株 BB-12 与 *B. animalis* subsp. *lactis* DSM 10140^T 及其他多株 *B. animalis* subsp. *lactis* 聚类在分类距离最近的一个分支上, Bootstrap 支持率为 52%。菌株 BB-12 与 *B. animalis* subsp. *lactis* DSM 10140^T 序列同源性为 100%, 与 *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527^T 同源性为 97.2%, 与 *B. bifidum* ATCC 29521 同源性为 96.1%, 与双歧杆菌属内其它种同源性均低于 90%, 鉴定结论为动物双歧杆菌乳亚种(*B. animalis* subsp. *lactis*), 在亚种水平上有很好的分辨率。

比较 16S rDNA 序列和 atpD 基因的系统发育分析结果, 两个区段得到具有一致拓扑结构的系统发育树, 但是, 基于同源性高于 99.1% 的 16S rDNA 序列分析, 无法将动物双歧乳亚种 DSM 10140^T 和动物双歧动物亚种 ATCC 25527^T 清楚分开, 而动物双歧乳亚种 DSM 10140^T 和动物双歧动物亚种 ATCC 25527^T 的 atpD 基因序列有 28 个核苷酸可替代, 碱基差异率达到 2.8%, 可以将两者清楚分开。

4 讨论

在传统的乳酸菌培养基 MRS 上, 含复合菌的乳产品中乳酸菌均可生长, 多种生长特点相近的乳酸菌通过简单的菌落形态和显微形态难以区分, 不便于双歧杆菌的检出计数^[12]。现有的双歧杆菌计数国标(GB/T 4789.34-2008)^[10], 需要在 BBL、PYG、TPY 培养基上生长的多种菌株分别进行生理生化鉴

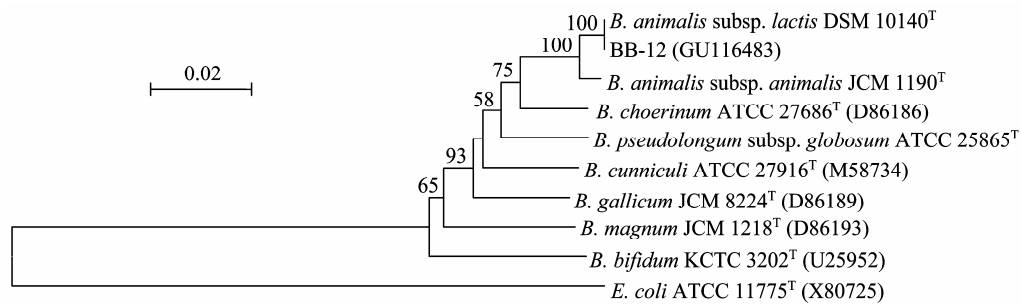


图 6 菌株 BB-12 与相关种的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA sequence data for strain BB-12 and other species of the genus *Bifidobacterium*

注: 采用 MEGA 3.1 软件, 邻位连接法显示菌株 BB-12 与相关种的 16S rDNA 序列系统发育树, 进行 1000 次的相似度重复计算, 图中发育树节点只显示 Bootstrap 值大于 50% 数值, 图例为遗传距离. *B.*: *Bifidobacterium*; *E.*: *Escherichia*.

Note: A neighbor-joining tree showing the 16S rDNA phylogenetic position of strain BB-12 and the relatively species using the software MEGA 3.1. Bootstrap values greater than 50% are shown in 1000 replicates. Bar, 0.02% nucleotide substitutions per site. *B.*: *Bifidobacterium*; *E.*: *Escherichia*.

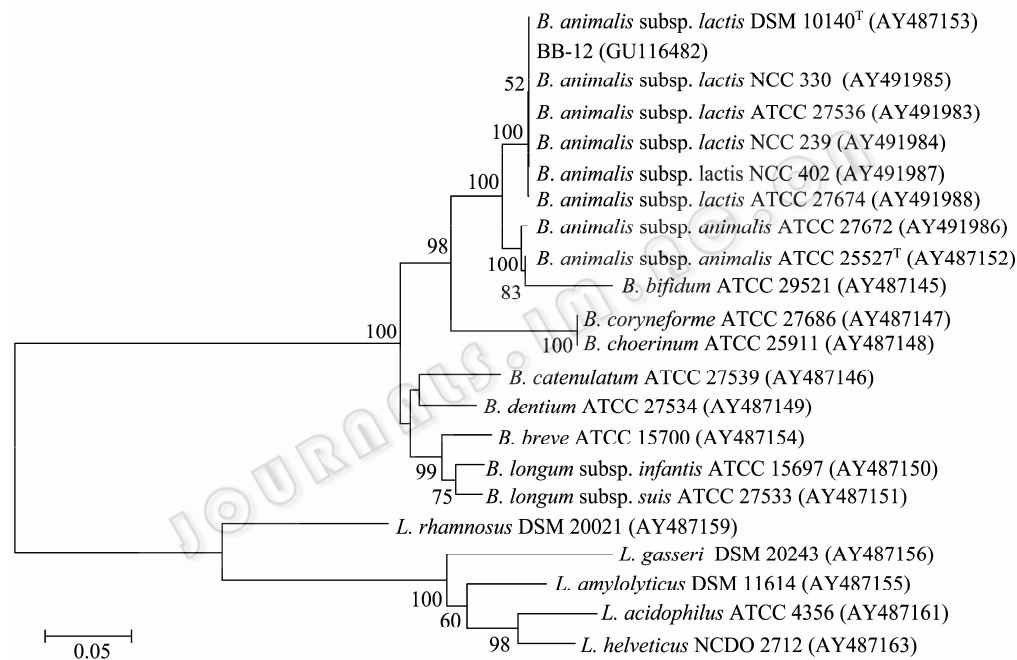


图 7 菌株 BB-12 与相关种的 atpD 基因系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree derived from atpD gene sequence data for strain BB-12 and other species of the genus *Bifidobacterium*

注: 采用 MEGA 3.1 软件, 邻位连接法显示菌株 BB-12 与相关种的 atpD 基因序列系统发育树, 进行 1000 次的相似度重复计算, 图中发育树节点只显示 Bootstrap 值大于 50% 数值, 图例为遗传距离.

Note: A neighbor-joining tree showing the atpD gene phylogenetic position of strain BB-12 and the relatively species using the software MEGA 3.1. Bootstrap values greater than 50% are shown in 1000 replicates. Bar, 0.05% nucleotide substitutions per site. *B.*: *Bifidobacterium*; *E.*: *Escherichia*; *L.*: *Lactobacillus*.

定及有机酸代谢产物测定, 确定双歧杆菌菌落后计数。国内学者针对此类问题做了一些相关的工作, 沈永才^[17]等应用荧光定量 PCR 法对双歧杆菌属内 6 个种 15 株菌进行了测定, 表明该方法可正确定量样品中双歧杆菌的数量。居建华等^[18]报道了一种新的双歧杆菌鉴别计数培养基, 依据大多数双歧杆菌具有半乳糖苷酶可特异性水解含半乳糖低聚糖的特

性, 在改良 MRS 培养基上加入 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖物质, 作为底物, 使双歧杆菌水解底物释放出吲哚, 产生颜色反应。本实验中, 在普通的 MRS 培养基基础上, 加入双氯青霉素钠盐、盐酸半胱氨酸、LiCl, 可一定程度抑制除双歧杆菌以外的其他乳酸菌生长, 降低培养环境中的溶解氧, 有利于双歧杆菌的生长, 虽然还是有部分链球菌同时生长,

但可通过菌落形态及细胞形态观察加以区分。

Atp 操纵子共有 8 个阅读框架, 相对应是一个 7.3 kb 的 DNA 片段。在双歧杆菌中 atp 操纵子的基因顺序为 atpBEFHAGDC, 这与已知的其他细菌 atp 顺序是一致的^[19], Atp 操纵子编码 F1-F0ATP 酶, 它是由两个亚单位组成, 分别是膜外的 F1 部分和膜内的 F0 部分, 此酶是双歧杆菌在酸性条件下生长的必要元素, 它能使双歧杆菌适应不同 pH 的环境。Atp 操纵子特别是 *atpD* 基因具有很高的稳定性和普遍性, 适合作为种系分类的分子标记^[20-21], 本实验的结果也表明 *atpD* 基因相比 16S rDNA 序列在动物双歧杆菌亚种水平鉴定上有更好的分辨率。

随着物种环境选择压力及自身的进化演变, 一些微生物在基因水平上会发生相应的改变, 依靠单基因对微生物鉴定有时就失去了精确性, 双歧杆菌种类繁多, 《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版)中列出了 33 个种, 加上后续发表的新种, 因此对双歧杆菌的多基因分析就显得尤为重要^[8]。同样, 多相鉴定也应相互补充相互印证鉴定结论。本实验中, 菌株 BB-12 宏观及微观形态符合双歧杆菌属特征, Biolog 鉴定系统给出双歧杆菌属(*Bifidobacterium* sp.)的结果, 16S rDNA 序列分析得到动物双歧杆菌(*B. animalis*)种水平的结果, *atpD* 基因分析得到动物双歧乳亚种(*B. animalis* subsp. *lactis*)亚种水平的结果, 多相鉴定技术手段与多基因分析间结果互相吻合。

参考文献

- [1] Prasad J, Gill H, Smart J, et al. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int Dairy J*, 1998(8): 993-1002.
- [2] Meile L, Ludwig W, Rueger U, et al. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Syst Appl Microbiol*, 1997(20): 57-64.
- [3] 卫生部监督局关于公开征求《可用于生产普通食品的菌种名单》和《可用于婴幼儿配方食品的菌种名单》意见的函。卫监督食便函(2009)74号。
- [4] Scardovi V, Trovattelli LD. *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb. nov. and the "minimum" and "subtile" groups of new bifidobacteria found in sewage. *Int J Syst Bacteriol*, 1974(24): 21-28.
- [5] Cai Y, Matsumoto M, Benno Y. *Bifidobacterium lactis* Meile et al. 1997 is a subjective synonym of *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka 1969) Scardovi and Yrovattelli

1974. *Microbiol Immunol*, 2000(44): 815-820.
- [6] Ventura M, Zink R. Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 2002(68): 6429-6434.
- [7] Zhu L, Li W, Dong X. Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003(53): 1619-1623.
- [8] Liesbeth M, Marco V, Ralf Z, et al. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004(54): 1137-1143.
- [9] Chevalier P, Roy D, Savoie LX. A Gal based medium for simultaneous enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria in milk. *Microbiological Methods*, 1991(13): 75-83.
- [10] 中华人民共和国国家标准. GB/T 4789. 34-2008.
- [11] 中华人民共和国国家标准. GB/T 4789. 35-2008.
- [12] 罗敏. 乳杆菌多相鉴定体系建立. 南昌大学硕士论文, 2007.
- [13] Draft International Standard ISO/DIS 29981 (IDF 220), 2008.
- [14] Alternative method for enumeration of Bifidobacteria in fermented milk products. *Chr. Hansen technical bulletin*, 2007(9): 11-12.
- [15] 程池, 杨梅, 李金霞, 等. Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程的研究. *食品与发酵工业*, 2006(5): 50-54.
- [16] 奥斯伯 F, 布伦特 R. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998: 1-113.
- [17] 沈永才, 袁佩娜. 16S rRNA 荧光定量 PCR 法检测双歧杆菌. *中国微生态学杂志*, 2001, 13(2): 66-72.
- [18] 居建华, 徐万军, 陈敏. 一种双歧杆菌鉴别计数培养基的研制. *中国微生态学杂志*, 2000, 12(5): 291-294.
- [19] Christensen H, Olsen JE. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on DNA sequence comparison of atpD encoding the subunit of ATP synthase. *FEMS Microbiol Lett*, 1998(161): 89-96.
- [20] Marco V, Carlos C, Douwe S, et al. *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: Identification of the atp (atpBEFHAGDC) operon and analysis of its genetic structure, characteristics, and phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004(70): 3110-3121.
- [21] Foster JW, HK Hall. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 1991(173): 5129-5135.