

新疆喀什地区母乳中乳酸菌的多样性分析

安美玲 张艳 刘忆冬 倪永清*

(新疆石河子大学食品学院 新疆 石河子 832000)

摘要:【目的】对新疆喀什地区母乳中乳酸菌多样性进行分析。【方法】采用菌落培养、显微镜观察、Repetitive genomic fingerprinting (Rep-PCR)指纹图谱和 16S rRNA 基因序列分析相结合的方法研究母乳中乳酸菌的菌群分布。【结果】从 11 份母乳中共分离出乳酸菌 193 株, 利用 16S rRNA 基因序列同源分析和系统发育树对代表菌株进行了分子鉴定, 193 株乳酸菌隶属于 4 个属, 分别为 *Lactobacillus* (22 株)、*Streptococcus* (42 株)、*Lactococcus* (40 株)、*Enterococcus* (89 株)。其中, *Enterococcus* 所占比例最大, 达到 46%。【结论】新疆喀什地区母乳中乳酸菌多样性丰富, 极具开发潜力, 将为开发母乳中的益生菌以及安全可靠的微生态制剂提供理论依据。

关键词: 母乳, 乳酸菌, 16S rRNA 基因序列

Biodiversity of lactic acid bacteria isolated from human breast milk of Kashi area in Xinjiang

AN Mei-Ling ZHANG Yan LIU Yi-Dong NI Yong-Qing*

(School of Food Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: [Objective] Assessment the diversity of lactic acid bacteria in the breast milk of healthy women. [Methods] The diversity of lactic acid bacteria was analyzed by using pure culture, repetitive genomic fingerprinting (Rep-PCR) analysis patterns and 16S rRNA gene sequence analysis. [Results] A total of 193 strains of lactic acid bacteria were obtained from eleven breast milk samples. The phylogenetic analysis showed that these strains belonged to four phylogenetic groups, they were *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Enterococcus* respectively. The dominant genus was *Enterococcus*, which is up to 46%. [Conclusion] The abundant diversity of lactic acid bacteria in the human breast milk of Kashi area in Xinjiang provided rich resources for exploiting probiotic lactic acid bacteria products.

Keywords: Human breast milk, Lactic acid bacteria, 16S rRNA gene sequence

Foundation item: Special Foundation for the Research and Commercialization of the Modern Agricultural Technologies of the Xinjiang Production and Construction Corps (No. 2015AC003)

*Corresponding author: E-mail: niyqlzu@sina.com

Received: November 30, 2016; **Accepted:** February 28, 2017; **Published online** (www.cnki.net): February 28, 2017
基金项目: 新疆兵团现代农业科技攻关与成果转化项目(No. 2015AC003)

*通讯作者: E-mail: niyqlzu@sina.com

收稿日期: 2016-11-30; 接受日期: 2017-02-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-28

母乳被认为是婴儿成长所需的最佳食物。它在婴儿的生存和生长方面扮演着重要角色, 不仅为婴儿提供所需要的营养物质, 而且直接或间接地增强婴儿肠道黏膜的屏障功能和免疫功能, 提高婴儿对疾病的抵抗能力^[1-2]。据报道, 母乳对婴儿肠道的贡献主要来源于其含有的多种生物活性成分。最新研究表明, 母乳中的微生物也可能是其来源因素之一^[3]。

最初学者们认为母乳中的微生物是由于受到外部环境的污染而导致的^[4-5], 但越来越多的研究表明, 母乳中的微生物不只是来自于外源污染, 而且存在一定的内源路径。Jiménez 等^[6]让妊娠期内的孕妇服用一定量含有 *Lactobacillus salivarius* CECT5713 和 *Lactobacillus gasseri* CECT5714 的益生菌生态制剂保健品一段时间, 结果显示约 60% 的产妇母乳中均检测到这两种益生菌。Arroyo 等^[7]通过对 124 名患有乳房炎症的产妇给服一定剂量含有 *Lactobacillus fermentum* CECT5716 的益生制剂, 结果显示超过半数的产妇母乳中检出该益生菌。随着科学技术的进步与发展以及研究手段的不断完善, 科学家们通过 PCR-DGGE/TGGE、qPCR 和高通量测序等现代生物学方法继续对母乳中的微生物进行研究, 已发现母乳中的微生物有 *Staphylococcus*、*Enterococcus*、*Streptococcus*、*Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 和 *Leuconostococcus* 等^[8-9]。随后, Albesharat 等在母乳样品中发现的细菌有 *Staphylococcus haemolyticus*、*Streptococcus gallolyticus*、*Streptococcus vestibularis*、*Enterococcus durans*、*Enterococcus hirae*、*Enterococcus mundtii*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus oris*、*Lactobacillus animalis* 等^[10]; Cabrera-Rubio 等在母乳样品中共检测到 700 多种细菌, 其中初乳(怀孕后期和婴儿出生后 4-5 d 以内的乳汁)中最常见的细菌属为 *Weissella*、*Leuconostococcus*、*Staphylococcus* 和 *Lactococcus*^[11]。这些研究均表明母乳中的确存在微生物, 并且是通过特定的内源性路线传输而来的, 它们可以源源不断地提供共生细菌促进婴儿肠道健康^[12-13], 保护婴

儿不受外源病菌的感染, 并且有助于其免疫系统的发展和成熟^[14]。

我国新疆地区地域广袤、少数民族众多(哈萨克、蒙古、维族、柯尔克孜、塔吉克等), 由于生活习性不同、交通不便、不同民族群体居住区气候反差很大、人口相对隔离, 为母乳中益生菌资源的开发提供了丰富的宿主来源。本文通过对新疆喀什地区少数民族妇女母乳中的乳酸菌进行分离与鉴定, 研究其种群结构, 以期开发针对少数民族群体、调节肠道菌群促进健康的营养食品, 为明确少数民族膳食结构对肠道菌群的影响机制及对健康的相关影响奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 实验的 11 份母乳样品来源于新疆喀什地区的健康妇女, 其中 2 份来自巴楚县, 4 份来自喀什市, 5 份来自塔什库尔干塔吉克自治县(简称: 塔县)。

1.1.2 母乳样品的采集: 产妇先戴好一次性无菌手套, 用无菌生理盐水浸泡的纱布轻轻擦拭乳头以及周围, 然后手动收集母乳, 丢弃第一滴, 然后将大约 4-5 mL 母乳收集于已灭菌的离心管内, 做好标记, 用封口膜将采样管口封好, 置于 4 °C 保存, 12 h 之内尽快运回实验室, 存储于 -20 °C 备用。

1.1.3 培养基: 改良 MRS 培养基: 除基础 MRS 培养基成分^[15]外, 另加 0.5% L-半胱氨酸。双歧 BS 培养基和乳杆选择性培养基, 购自青岛科技园海博生物技术有限公司。

1.1.4 参考菌株: *Lactobacillus lactis* subsp. *Lactis* CGMCC1.1936、*Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* CGMCC1.3992、*Bifidobacterium bifidum* CGMCC1.5091 均购于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

1.1.5 主要试剂和仪器: 磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、葡萄糖、氯化钠、天津市福晨夫化学试剂厂; 硫

酸镁、硫酸锰、吐温-80、胰蛋白胨、碘、氢氧化钠,天津市巴斯夫化学试剂厂;无水乙醇、冰醋酸,天津市致远化学试剂厂;L-半胱氨酸,上海蓝季科技发展有限公司;乳杆选择性培养基、双歧BS培养基,青岛科技园海博生物技术有限公司;2×EsTaq Master Mix (Dye),北京康为世纪生物科技有限公司;Marker 5000,天根生化科技(北京)有限公司;全自动高压灭菌锅(LAC-5040S),韩国LabTech有限公司;智能生化培养箱(SPX),宁波市江南仪器厂;高速冷冻离心机(5810R),德国Eppendorf仪器公司;凝胶成像系统(GelDoc XR),美国Bio-Rad公司;PCR扩增仪(TC-512 PCR),英国Techne公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化:取 100 μL 母乳样品于 1 mL 已灭菌的 MRS 液体培养基试管中,将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 无氧条件下培养 24 h;将培养基凝固完全的培养皿置于无氧条件下 2–3 h,使培养基内含有的氧化还原剂(即刃天青)变成无色,达到无氧的程度为止;吸取富集好的母乳 100 μL 至 900 μL 无菌水稀释液中,得到 10^{-1} ,依次做 5 个梯度,取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的梯度菌悬液 100 μL ,分别接种到预还原的固体培养皿中,涂布均匀。对每个培养皿进行相对应的稀释度标记,每个稀释度做 3 个平行,并留空白培养皿作对照,然后将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧条

件下倒置培养约 48 h,直到培养基表面出现菌落;之后,用灼烧灭菌的接种环在每种培养基表面各挑取菌落特征不同的 10 株左右的菌种,然后置于无菌水中稀释摇匀后,用接种环蘸取少量稀释液,在固体培养基上“之”字形划线,反复划线培养 3 次得到单菌落。

1.2.2 镜检:仔细观察已纯化的菌落形态,挑取单菌落于载玻片,置于相差显微镜下进行初步镜检,观察其细胞形状、大小、排列、运动情况等,然后革兰氏染色后进一步镜检,同时进行接触酶试验。将革兰氏染色阳性、接触酶试验阴性的菌株暂定为乳酸菌。

1.2.3 菌株 DNA 的提取:参照文献[16]提取单菌落 DNA,保存至 -20°C ,即可进行 PCR 扩增。

1.2.4 乳酸菌种、属鉴定:通过镜检,细胞形态为杆状的细菌用 *Lactobacilli* sp.和 *Bifidobacterium* sp.引物进行 PCR 扩增,球状的细菌用 *Enterococcus* sp.和 *Lactococcus* sp.引物扩增,各属特异性引物的信息见表 1。扩增反应结束后,取约 3 μL 的 PCR 扩增产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。根据产物是否有目的条带,将乳酸菌大致鉴定至属。

1.2.5 16S rRNA 基因序列分析:采用通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为(25 μL): 2×EsTaq Master Mix 12.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 27F 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 1492R 0.5 μL , 100 ng/ μL DNA 模板

表 1 文中所用属间引物信息
Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

属 Genus	引物 Primer	正向/反向 R/F	序列 Sequence (5'→3')	产物大小 The product size (bp)	参考文献 Reference
<i>Bifidobacterium</i> sp.	g-Bifid	R	GGTGTTCCTCCCGATATCTACA	549–563	[17]
	g-Bifid	F	CTCCTGGAAACGGGTGG		
<i>Enterococcus</i> sp.	Ent1	R	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	[18]
	Ent2	F	AACTTCGTCACCAACGCGAAC		
<i>Lactobacilli</i> sp.	LbLMA1-rev	R	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC	250	[19]
	R16-1	F	CTTGACACACCGCCCGTCA		
<i>Lactococcus</i> sp.	1RL	R	TTTGAGAGTTTGATCCTGG	700	[4]
	2RR	F	TCTACGCATTTACCCGCTA		

1 μL , ddH₂O 10.5 μL 。PCR 反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 次循环; 72 °C 10 min。取 3 μL PCR 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 Rep-PCR 指纹图谱: 以 GTG₅ (5'-GTGGTG GTGGTGGTG-3') 为引物进行 Rep-PCR 扩增, 其体系为 (25 μL): 2 \times EsTaq Master Mix 12.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ GTG₅ 1.5 μL , 100 ng/ μL DNA 模板 3 μL , ddH₂O 8 μL 。PCR 扩增程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 65 °C 8 min, 35 个循环; 65 °C 15 min。PCR 扩增产物在 180 V (4.5 V/cm) 电压下检测约 120 min, 结束后, 在紫外凝胶成像仪中观测 DNA 图谱并拍照, DNA 带型完全一致的菌株通常认为同一物种。然后挑取不同图谱类型的 16S rRNA 基因 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。

1.2.7 构建系统发育树: 将所测得的 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank 数据库中, 用 BLAST 进行相关序列的搜索, 与 GenBank 数据库中现有的近缘菌株的序列比较, 并从数据库获得相关属、相关种的 16S rRNA 基因序列, 建立系统发育树。序列用 ClustalX 软件对齐, 进化距离的计算应用邻接法 Neighbor-Joining, 采用 P-distances 法和 Kimura-2 parameter 双参数法进行, 进化树分支模式的稳定性用 MEGA V5.0 软件分析, 采用 Bootstrap 法, 重复次数为 1 000, 构建进化树。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与镜检

从 11 份母乳样品中, 共分离到 193 株革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性的纯培养物, 初步将其确定为乳酸菌, 通过革兰氏染色, 显微镜观察, 其中 22 株为杆状, 171 株为球状, 它们的排列方式有单个、成对或成链。菌落形态大都为白色或乳白, 圆形, 直径为 0.5 mm–2.0 mm (图 1)。

2.2 乳酸菌属间鉴定

利用属间引物进行 PCR 扩增, 结果显示, 193 株乳酸菌中, 有 22 株属于 *Lactobacilli*, 其扩增片段位于 250–280 bp 之间(图 2), 其所占比例为 11%; 89 株属于 *Enterococcus*, 占 46%, 所占比例最大; 42 株属于 *Streptococcus*, 有 40 株归属于 *Lactococcus*, 未检测到 *Bifidobacterium*, 各属所占比例如图 3 所示。

2.3 16S rRNA 基因扩增及系统发育树的构建

通过 Rep-PCR 指纹图谱结果(部分如图 4 所示), 从相同条带中选取一株作为代表菌, 共选取 11 株代表菌, 将其 16S rRNA 基因 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 然后将测序结果提交到 GenBank 数据库中, 与 GenBank 数据库中现有的近缘菌株的序列比对, 构建系统发育树(图 5)。

由系统发育树可知, 11 株乳酸菌归属于 4 个属, 分别为 *Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Enterococcus*

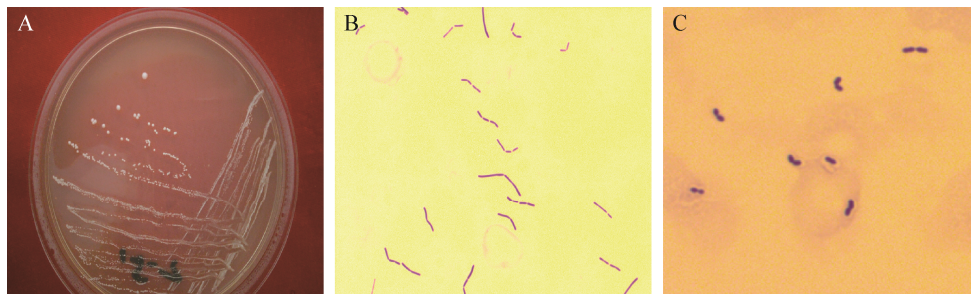


图 1 乳酸菌菌落形态及其细胞形态(100 \times)

Figure 1 Colonies and cell morphology of lactic acid bacteria (100 \times)

注: A: 菌株 SHZ1-M-6 菌落形态; B: 菌株 SHZ1-R-13 细胞形态; C: 菌株 YL13-M-413 细胞形态。

Note: A: Colonies morphology; B: Cell morphology of SHZ1-R-13; C: Cell morphology of YL13-M-413.

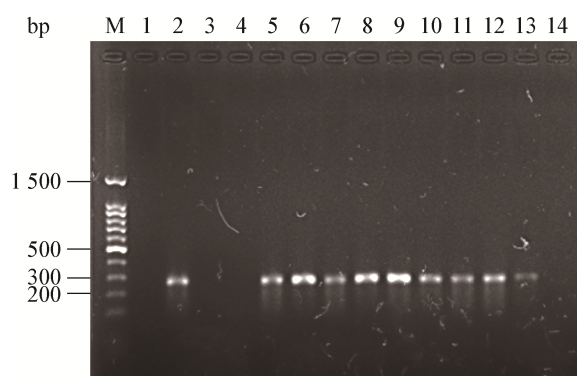


图2 *Lactobacilli* sp. 扩增产物

Figure 2 PCR amplification products from *Lactobacilli* sp.

Note: M: Marker 100 bp ladder; 1: SHZ1-M-6; 2: SHZ1-M-7; 3: SHZ1-M-8; 4: SHZ1-M-9; 5: SHZ1-R-11; 6: SHZ1-R-13; 7: SHZ1-M-18; 8: SHZ1-R-20; 9: TX33-M-8; 10: TX33-M-9; 11: TX33-B-7; 12: TX33-B-6; 13: TX33-S-6; 14: TX33-S-5.

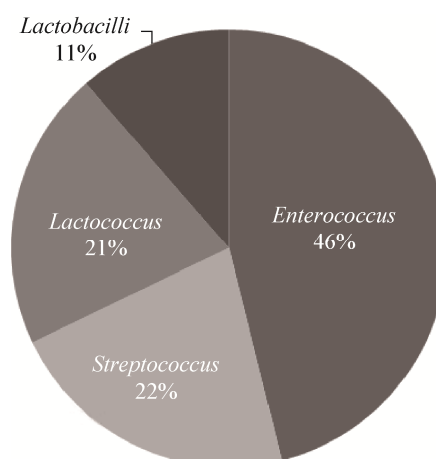


图3 母乳中乳酸菌所占百分比

Figure 3 The percentage of lactic acid bacteria in human breast milk

和 *Streptococcus*。菌株 SHZ1-M-18、SHZ1-B-67、TX33-R-372 和 TX33-R-397 隶属于 *Lactobacillus*，其中 SHZ1-M-18 和 SHZ1-B-67 与 *L. gasseri* 的序列相似性最高，TX33-R-372 和 TX33-R-397 与 *Lactobacillus casei* 的相似性达到 99%；菌株 YL13-M-413、YL13-B-422、YL21-R-438 和 YL21-R-462 归属于 *Enterococcus*，YL13-M-413 和 YL13-B-422 与 *E. faecalis* 的相似性最近，YL21-R-438 和 YL21-R-462 与 *E. faecium* 的系统发育关系最近；菌株 YL21-B-428 属于 *Lactococcus*，它与 *Lactococcus lactis* strain 17 (KT633922.1) 的相

似性达到 100%。菌株 YL64-M-456 和 YL67-M-410 归于 *Streptococcus*，它们与 *S. salivarius* 的鉴定值达到 99%。

表 2 显示，*Enterococcus* 在 4 个属中所占比例为 46%，属于优势菌属，其中 *E. faecalis* 在喀什市 YL13 样品中所占比例最高，为 84.6%；*E. faecium* 在喀什市 YL21 样品中所占比例最大；*Lactobacillus* 主要分离自巴楚县 SHZ1 和塔县 TX33 的样品中，在其他样品中，未能分离出 *Lactobacillus*；*Lactococcus* 在其中 8 份样品中出现，而 *S. salivarius* 在 11 份样品中都有检出，属于优势菌种。

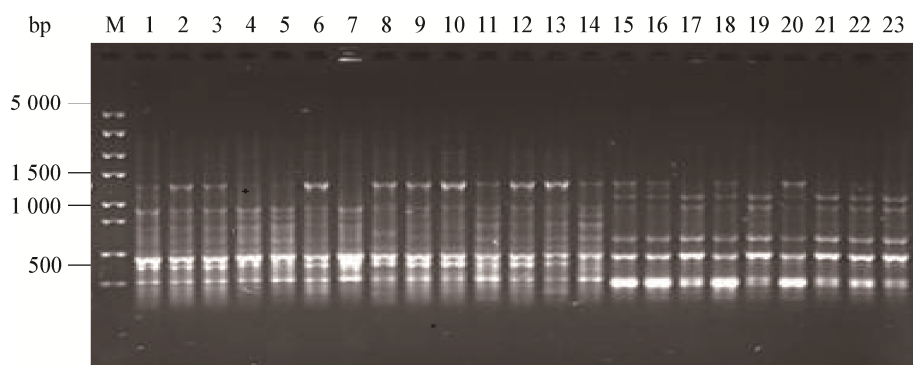


图4 母乳中部分细菌菌株的 Rep-PCR 指纹图谱

Figure 4 Rep-PCR fingerprint patterns of partial bacterial strains in 2% agarose

Note: M: Marker 5000 ladder; 1: SHZ1-M-7; 2: SHZ1-B-11; 3: SHZ1-R-13; 4: SHZ1-M-18; 5: SHZ1-R-20; 6: SHZ1-R-21; 7: SHZ1-M-22; 8: SHZ1-M-23; 9: SHZ1-M-27; 10: SHZ1-R-56; 11: SHZ1-R-60; 12: SHZ1-B-67; 13: SHZ1-R-87; 14: TX33-M-8; 15: TX33-M-9; 16: TX33-M-7; 17: TX33-M-6; 18: TX33-M-3; 19: TX33-M-5; 20: TX33-M-4; 21: TX33-B-7; 22: TX33-B-6; 23: TX33-B-8.

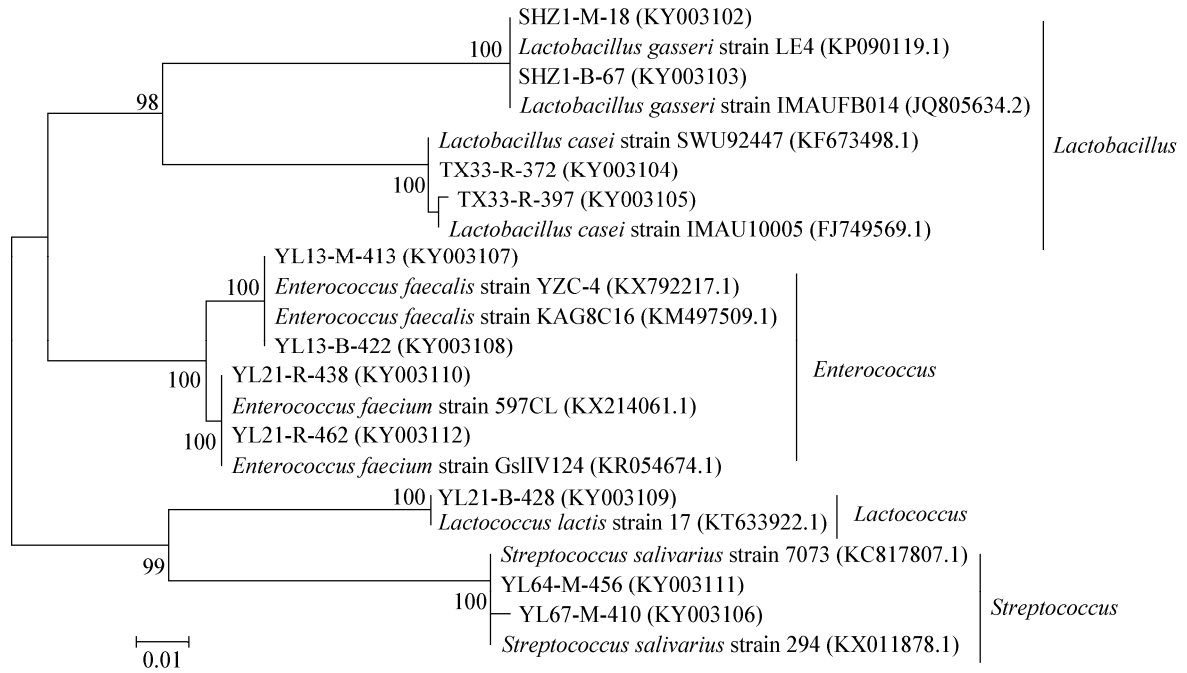


图 5 基于 16S rRNA 基因序列的菌株系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of strains based on partial 16S rRNA gene sequences

注：序列的登录号位于圆括号内；系统发育树分支点处的数字表示基于 1 000 重取样数据集的 Bootstrap 支持率(>50%)；标尺表示 100 个核苷酸中有 1 个被替换。

Note: The accession number is shown in parenthesis. Numbers at the branch points indicated the level of bootstrap support based on 1 000 resampled data sets (>50%). The scale bar corresponds to 0.01 substitutions per nucleotide position.

表 2 新疆喀什地区不同母乳样品中乳酸菌分布

Table 2 The distribution of lactic acid bacteria in human breast milk from Kashi of Xinjiang

样品 Sample		<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	Total
巴楚县 Bachu County	SHZ1	12	—	4	3	7	6	32
	SHZ6	—	—	7	2	8	8	25
	YL21	—	—	—	14	3	4	21
喀什市 Qeshqer Shehiri	YL64	—	—	2	—	4	3	9
	YL67	—	—	4	3	4	3	14
	YL13	—	—	11	1	1	—	13
	TX33	—	10	6	—	2	3	21
塔什库尔干塔吉克 自治县 Tashikuergantajike	TX28	—	—	7	2	5	4	18
	TX38	—	—	4	5	2	6	17
	TX35	—	—	3	4	2	3	12
	TX37	—	—	4	3	4	—	11
Total		12	10	52	37	42	40	193

注：—：样品中未分离到。

Note: —: No strain in sample.

3 结论与讨论

早在 30 年前就有报道在母乳中发现微生物, 但当时认为是受到污染所致^[20]。随着科学技术的进步, 大量实验证明母乳中确实存在丰富的微生物。本实验中, 我们对 11 份母乳样品中的乳酸菌检测显示, 分离到的乳酸菌菌株归属于 *Enterococcus*、*Streptococcus*、*Lactobacillus* 和 *Lactococcus* 四个属, 其中, *Enterococcus* spp. 占比最大(46%), 为优势菌属。Collado 等在 50 份母乳样品中检测到了 *Staphylococcus*、*Streptococcus*、*Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium*, 其中 96% 的母乳中发现 *Clostridium* clusters XIVa–XIVb, 属于优势菌, 其次是 *Enterococcus*^[21], 这与我们的研究结果有着相似之处。但采用特异性培养基的厌氧分离, 我们的实验中并未分离到 *Bifidobacterium* spp., 这可能与我们的母乳样品有关。本次试验样品均为医院产后的妇女母乳, 因此大多数母乳属于初乳。最近有人对初乳中的乳酸菌进行了分离培养, 只有少部分样品中存在 *Bifidobacterium* spp.; 采用分子生物学研究方法研究显示, 初乳微生物的种群构成及均匀度明显不同于成熟乳, 初乳的微生物群落结构中 *Bifidobacterium* spp. 数量很少^[22]。此外, 母乳微生物结构的不同与母体的分娩方式(剖腹产, 自然分娩)、民族饮食习惯有关系^[23]。新疆南北疆气候差异显著, 喀什地处南疆, 生态环境复杂、少数民族众多, 他们在饮食上的特异性有可能赋予母乳中微生物很高的多样性, 本研究将进一步广泛取样少数民族成熟乳样品, 以期分离到民族特异的 *Bifidobacterium* spp. 益生菌菌株。

本实验中, 11 份样品中都分离到了 *S. salivarius*, 统计显示属于优势种。有研究表明 *S. salivarius* 也属于益生菌, 它是婴幼儿口腔中最先定殖的细菌, 是口腔内正常的菌群组成成员, 可参与宿主局部生物屏障的构成, 维持宿主口腔菌群的生态平衡^[24]。此外, 我们分离到的 22 株 *Lactobacillus* 中, 12 株属于 *L. gasseri*, 10 株属于 *L. casei*。 *Lactobacillus* 的益生性已被不少文献所证实, 例如, 2006 年

Olivares 等证明 *Lactobacillus gasseri* CECT5714 可以增加感染病原菌实验小鼠的存活率, 同时, 通过建立感染沙门氏菌的动物模型试验证明了这种益生菌具有抗感染作用^[25]。目前在功能食品开发和临床上使用的益生菌菌株大多数来源于动物肠道以及婴幼儿排泄物, 相对来说对母乳中益生菌分离、鉴定, 深入研发的相关报道较少。我们的研究显示, 母乳中存在大量的 *Lactobacillus*, 这将为后续新疆地区少数民族母乳中的益生菌菌株资源的深入研究, 开发安全可靠的微生态制剂提供了新的研究思路 and 基础。

参考文献

- [1] Walker A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients[J]. The Journal of Pediatrics, 2010, 156(S2): S3-S7
- [2] Petherick A. Development: Mother's milk: A rich opportunity[J]. Nature, 2010, 468(7327): S5-S7
- [3] Li SQ, Ma SQ, Yu KF, et al. Species and origin of microorganisms in breast milk and their effects on infants[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2016, 24(12): 1846-1852 (in Chinese)
李思奇, 马守庆, 余凯凡, 等. 母乳微生物种类和来源及其对新生儿代作用的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(12): 1846-1852
- [4] Gavin A, Ostovar K. Microbiological characterization of human milk[J]. Journal of Food Protection, 1977, 40(9): 614-616
- [5] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(26): 11971-11975
- [6] Jiménez E, Fernández L, Maldonado A, et al. Oral administration of *Lactobacilli* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4650-4655
- [7] Arroyo R, Martín V, Maldonado A, et al. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk[J]. Clinical Infectious Diseases, 2010, 50(12): 1551-1558
- [8] Jiménez E, Delgado S, Fernández L, et al. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors[J]. Research in Microbiology, 2008, 159(9/10): 595-601
- [9] Martín V, Maldonado-Barragán A, Moles L, et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces[J]. Journal of Human Lactation, 2012, 28(1): 36-44
- [10] Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, et al. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food,

- breast milk and faeces of mothers and their babies[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34(2): 148-155
- [11] Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, et al. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2012, 96(3): 544-555
- [12] Heikkilä MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(3): 471-478
- [13] Martin R, Langa S, Reviriego C, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut[J]. *The Journal of Pediatrics*, 2003, 143(6): 754-758
- [14] Chiu YH, Tsai JJ, Lin SL, et al. Characterisation of bifidobacteria with immunomodulatory properties isolated from human breast milk[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 7: 700-708
- [15] Li MH. Isolation and identification of bifidobacteria in human faeces in parts of China and screening of the strains with potential probiotic properties[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2012 (in Chinese)
李梅花. 中国部分地区人体粪便中双歧杆菌的分离鉴定及具潜在益生特性菌株的筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2012
- [16] Ni YW, Lan GW, Yang SJ, et al. Diversity of *Lactobacillus* isolates in fermented dairy products from different regions of Xinjiang[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(6): 104-109 (in Chinese)
倪亚雯, 兰国伟, 杨尚娇, 等. 新疆不同地域发酵乳品中 *Lactobacillus* 多样性的研究[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(6): 104-109
- [17] Matsuki TK, Watanabe J, Fujimoto Y, et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(11): 5445-5451
- [18] Ke DB, Picard FJ, Martineau F, et al. Development of a PCR assay for rapid detection of *Enterococci*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(11): 3497-3503
- [19] Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M. A PCR-based method for identification of *Lactobacilli* at the genus level[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 214(2): 271-275
- [20] Pu ZY, Dobos M, Limsowtin GK, et al. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93(2): 353-361
- [21] Collado MC, Delgado S, Maldonado A, et al. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48(5): 523-528
- [22] Quince C, Lanzén A, Curtis TP, et al. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(9): 639-641
- [23] Huang WQ. Microbial diversity of human breast milk in four areas of China[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2015 (in Chinese)
黄卫强. 中国四个地区人母乳中微生物多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2015
- [24] Wen YL, Wan HC. Research progresses in administer *Streptococcus salivarius* to halitosis[J]. *International Journal of Stomatology*, 2008, 35(5): 523-525 (in Chinese)
温艳丽, 万呼春. 唾液链球菌在口臭治疗中的研究进展[J]. *国际口腔科学杂志*, 2008, 35(5): 523-525
- [25] Olivares M, Díaz-Roperó MP, Martín R, et al. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101(1): 72-79