

多项分类方法鉴定西藏地区藏灵菇中的乳酸球菌

孙婷 王芳 李梅花 孙春玲 刘文俊 于洁 张家超 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 【目的】采用多项分类法对 16 株分离自藏灵菇中的乳酸球菌进行准确鉴定。【方法】首先应用传统的生理生化试验,之后采用 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析和变性梯度凝胶电泳(DGGE)进行了鉴定,最后,通过 16S rRNA 基因序列分析进行验证。【结果】将 16 株菌株初步鉴定为 3 个菌群:片球菌群、乳球菌群和肠球菌群,进一步鉴定为 14 株耐久肠球菌,1 株乳酸片球菌,1 株乳酸乳球菌乳酸亚种,16S rRNA 基因序列分析验证的结果与前 3 种试验方法的结果相一致。【结论】试验结果表明传统的生理生化鉴定和 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析和变性梯度凝胶电泳(DGGE)相结合的多项分类方法有利于乳酸球菌种间的准确鉴定。

关键词: 藏灵菇, 多项分类法, 鉴定

Identification of lactic acid cocci from Tibetan kefir grains using polyphasic taxonomy method

SUN Ting WANG Fang LI Mei-Hua SUN Chun-Lin LIU Wen-Jun
YU Jie ZHANG Jia-Chao ZHANG He-Ping*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Bioengineering, Education Ministry of China,
Department of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University,
Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Objective] Polyphasic Taxonomy Method was used to identify 16 strains of *Lactic acid cocci* from Tibetan kefir. [Methods] Traditional physiological and biochemical method、

基金项目: 农业部现代农业产业技术体系建设项目(No. nycytx-0501); 国家 863 计划项目(No. 2011AA100902); 国家 973 计划前期研究专项(No. 2010CB134502)

*通讯作者: ✉: hepingdd@vip.sina.com

收稿日期: 2011-11-07; 接受日期: 2012-01-06

16S-23S rRNA Intergenic spacer region polymorphism、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and 16S rRNA gene sequences analysis were carried out in this investigation. [Results] 16 strains were identified as *Enterococcus*, *Lactococcus* and *Pediococcus*, specifically 14 *Enterococcus durans* strains, 1 *Pediococcus acidilactis* strain and 1 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain. 16S rRNA gene sequences analysis was agreed with the previous results of three methods. [Conclusion] The results showed that polyphasic taxonomy method combined with traditional physiological and biochemical identification method, 16S-23S rRNA Intergenic spacer region polymorphism, DGGE and 16S rRNA gene analysis was suitable to accurately identify *Lactic acid cocci*.

Keywords: Tibetan kefir grains, Polyphasic taxonomy method, Identification

藏灵菇又称“西藏灵菇”，是一种乳白色、胶质块状物，外形酷似米粒，上面栖息着多种微生物，能在乳中快速生长，并集结成块，看起来很像雪莲，也称“西藏雪莲”^[1]。据相关文献记载，“西藏雪莲”主要具有以下功效：(1) 可以加速唾液、胃酶及胰酶的分泌，增强食欲和帮助消化。(2) 乳酸菌分解糖所产生的乳酸和醋酸，具有使肠内pH下降，抑制腐败菌和病原菌繁殖，从而抑制小肠腐败。微量的乙醇可以促进新陈代谢，使循环系统及神经系统的活动正常化，对于胃肠病、代谢异常病有较好的治疗与预防作用。(3) 能够降低胆固醇，有效防止高血压、冠心病等心血管疾病的发病率。(4) 其活性物质成分以及微生物所形成的抑制致病菌的抗菌性物质能抑制癌症的发生及癌细胞增殖^[2-4]。

目前对藏灵菇的研究还属于起步阶段，相关的报告并不多，根据一些相关文献的报道藏灵菇中主要的微生物是乳酸菌和酵母菌，其中乳酸菌包括开菲尔乳杆菌、嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、发酵乳杆菌、格氏乳杆菌、肠膜明串珠菌、乳酸乳球菌；酵母菌包括啤酒酵母、假丝酵母、克鲁维酵母、单孢酵母等^[5]，同时也有部分文献报道过藏灵菇中含有醋酸菌^[6]，肖琳琳等人从藏灵菇中分离出多株乳球菌、乳杆菌和酵母菌，并从中筛选出一株能高效降解胆固醇

的干酪乳杆菌^[7]，刘变芳等人也从藏灵菇中分离出乳杆菌、乳球菌及酵母菌^[8]。然而，近年来对藏灵菇中乳酸球菌的研究比较少，特别是运用多种方法研究其中乳酸球菌成分的更少，即使有些文献报道，但其研究手段主要采用传统的鉴定方法。本研究采用传统的生理生化试验与16S rRNA基因序列分析、变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)、16S-23S rRNA间区序列多态性分析等分子生物学技术相结合的多项分类手段对藏灵菇中的乳球菌进行了鉴定和研究，期望更全面、准确地对藏灵菇中乳酸球菌进行分离、鉴定和优势菌群分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源及模式菌株: 2份藏灵菇样品采集于西藏日喀则地区江孜县东郊乡和西藏那曲县桑雄乡。本试验以购买自美国模式菌种培养物保藏中心(ATCC)的 *Enterococcus durans* ATCC 19432 作为试验的参考菌株。

1.1.2 各种培养基与试剂: 改良 MRS 琼脂培养基配方(g/L): 大豆蛋白胨 10, 牛肉浸取物 10, 酵母提取物 5, 葡萄糖 20, 乙酸钠 5, 柠檬酸三钠 2, 吐温 1, 磷酸氢二钾 2, 七水硫酸镁 0.2, 七水硫酸锰 0.054, 琼脂 15, 放线菌酮 1×10^{-3} , 蒸馏水 1 L。

在原有配方中添加 1 g/L 的放线菌酮从而达到抑制真菌生长的目的。TPY 液体培养基, BLB 液体培养基, 以及其它生理生化试验和糖发酵试验所用培养基和试剂, 参照文献[9]配制。

1.1.3 试验主要仪器: 试验主要仪器: 变性梯度凝胶电泳仪、PTC-200 型梯度基因扩增仪, 伯乐公司; 电泳仪, Applied biosystem 公司; TGL-16B 高速离心机、TGL-16G-A 型高速冷冻

离心机, 安亭公司; ND-1000 型微量紫外分光光度计, Eppendorf 公司; MLS-3780 型全自动高压蒸汽灭菌器, 三洋公司; HHSI-NI 恒温水浴槽, 北京长安科学仪器厂; DHP-9272 电热恒温培养箱, 上海雷韵试验仪器制造有限公司; DOC2000 型 UPV 凝胶成像分析系统, 北京六一仪器厂; 本试验所用引物均由上海桑尼生物科技有限公司合成, 具体引物序列见表 1。

表 1 试验所用引物
Table 1 Primers used in this study

扩增基因 Amplification genes	引物 Primers	核酸序列 Sequence (5'→3')
16S rRNA 基因 16S rRNA Gene	A27F A1495R	CTACGGCTACCTTGTTACGA AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S-23S rRNA 间区 16S-23S rRNA ISRs	LI G17	CAAGGCATCCACCGT GTGAAGTCGTAACAAGG
16S rRNA 基因 V3 区 16S rRNA Gene V3	V3F V3R	CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGCGG GGGCACGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG

1.2 方法

1.2.1 菌株分离及保存: 取经过初步培养后的藏灵菇发酵乳 1 mL, 用生理盐水依次稀释至 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 倍, 每个稀释度取 0.1 mL 涂布于改良 MRS 琼脂培养基, 37 °C 厌氧培养 48 h, 然后随机选取典型菌落, 进行培养、涂片、革兰氏染色、镜检、过氧化氢酶实验。凡过氧化氢酶阴性、革兰氏阳性的球菌初步定为乳酸菌球菌, 继续在相应的培养基上划线纯化, 如此重复 3 次, 直至镜检为纯培养物。将纯化后的菌株于真空冷冻进行保存。

1.2.2 乳酸菌球菌的生理生化鉴定: 重新活化初步鉴定为乳酸球菌的菌株, 据参考文献[9-11]对供试菌株进行生理生化试验和糖发酵试验, 对照菌株为 *Lactobacillus casei* ATCC 393、*Lactococcus lactis* subsp. *cremons* ATCC 19257, 由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供。

1.2.3 菌株基因组 DNA 的提取: 将供试菌株采用改良的 CTAB-冻融方法提取菌株基因组 DNA^[12], 即用液氮反复冻融后进行提取。

1.2.4 变性梯度凝胶电泳: PCR 扩增选用引物 V3F 和 V3R^[13], 对供试菌株和参考菌株的 16S rRNA 基因的 V3 区进行扩增, 选用引物 V3F G+C 和 V3R G+C^[14]。扩增反应体系(50 μ L)含如下成分: 基因组 DNA 模板约 50 ng; dNTP (2.5 mmol/L each, TaKaRa) 2 μ L; 两条引物 V₃F G+C 和 V₃R G+C 的终浓度均为 0.4 mol/L; 1.5 U DNA *Taq* 聚合酶(TaKaRa) 0.5 μ L; 10 \times PCR Buffer 5 μ L。扩增反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 65 °C 50 s, -0.5 °C 循环, 72 °C 3 min, 共 20 个循环; 94 °C 40 s, 55 °C 50 s, 72 °C 3 min, 共 10 个循环; 72 °C 7 min。将 300 ng 扩增产物于 8% 的聚丙烯酰胺胶上进行分离, 变性剂梯度范围为 27%–52% (100% 的变性剂包含 7 mol/L 尿素和 40% 去离子

甲酰胺)。电泳在恒温 60 °C 下 1×TAE 缓冲液中进行, 电压 200 V, 时间 4 h。电泳结束后进行银染并对电泳图谱进行分析。将银染后的凝胶条带小心切下, 溶于 100 μL TE 溶液中, 过夜后取 3 μL 该溶液作为再次扩增的模板, 使用不含 GC 夹子的 V₃ 区引物进行扩增, 而后将扩增产物测序。

1.2.5 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析: 以供试菌株的 DNA 为模板, 应用 16S-23S rRNA 间区引物 L1 和 G17^[15] 进行 PCR 扩增。扩增反应体系(25 μL)含如下成分: 基因组 DNA 模板约 50 ng; dNTP 浓度为 200 μmol/L; 两条引物 L1 和 G17 的浓度均为 10 pmol/L; DNA *Taq* 聚合酶 1.5 U; 1×PCR buffer。扩增反应程序: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 8 min^[16]。扩增 16 株供试菌株和 1 株参考菌株的 16S-23S rRNA 间区序列。将扩增产物用 2% 的琼脂凝胶在电压 60 V 的条件下电泳 3 h, 而后将电泳

凝胶用溴化乙锭(EB) 染色并分析电泳结果。

1.2.6 16S rRNA 基因序列分析: 使用实验室自主设计的引物 A27F 和 A1495R 对参考菌株的 16S rRNA 片段进行扩增, 菌体扩增条件如下: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。将扩增成功的 PCR 产物寄往上海桑尼生物科技有限公司测序, 将测序结果运用 DNASTAR 软件进行序列拼接、校准、排齐。然后上传到 NCBI 数据库并 BLAST 比对, 最后应用 MEGA 4.0 软件制作系统发育树并完成同源性分析。

2 结果与分析

2.1 乳酸球菌的传统方法鉴定结果

将革兰氏阳性, 过氧化氢酶试验阴性的球菌进行生理生化试验, 试验结果如表 2、表 3 所示, 根据参考文献[9-11]将 16 株菌株归为 3 个菌群:

表 2 生理生化试验结果
Table 2 Results of biochemical test

Strain	Growth at 10 °C	Growth at 45 °C	Growth in 18% NaCl	Growth in 6.5% NaCl	pH 4.5	pH 9.0	NH ₃
IMAU60189	-	+	-	+	+	-	+
IMAU60193	+	-	-	-	+	+	+
IMAU60172	+	+	-	+	+	+	+
IMAU60190	+	+	-	+	+	+	+
IMAU60179	+	+	-	+	+	+	+
IMAU60182	+	+	-	+	+	+	+
IMAU60181	+	+	-	+	+	+	-
IMAU60191	+	+	-	+	+	+	+
IMAU60186	+	+	-	+	+	+	+
IMAU60173	+	+	-	+	+	+	-
IMAU60184	+	+	-	+	+	+	+
IMAU60183	+	+	-	+	+	+	-
IMAU60185	+	+	-	+	+	+	+
IMAU60174	+	+	-	+	+	+	+
IMAU60192	+	+	-	+	+	+	+
IMAU60175	+	+	-	+	+	+	+
ATCC 393	+	+	-	+	+	-	-
ATCC 19257	+	-	-	-	+	-	-

注: +、-: 菌株为阳性或阴性反应。

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

表3 糖发酵试验结果
Table 3 Saccharide fermentation properties of Separated strains

Strains	Arabinose	Raffinose	Mannitol	Fructose	Galactose	Sucrose	Maltose	Lactose	Glucitol	Melibiose	Melezitose	Xylose
IMAU60189	+ _w	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
IMAU60193	-	-	+ _w	+	+	+	+	+	-	-	-	-
IMAU60172	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
IMAU60190	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+ _w	-	-
IMAU60179	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+ _w	-	-
IMAU60182	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
IMAU60181	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
IMAU60191	-	-	+ _w	+	+	-	+	+	-	-	-	-
IMAU60186	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
IMAU60173	-	-	+	+	+	+	+ _w	+	+	+	-	-
IMAU60184	-	-	+	+	+	+	+ _w	+	-	-	+ _w	-
IMAU60183	-	-	+ _w	+	+	-	+	+	-	+	-	-
IMAU60185	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IMAU60174	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
IMAU60192	-	+ _w	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
IMAU60175	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
ATCC 393	-	-	+	+	+	+	+	+ _w	+	+	-	-
ATCC 19257	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-

注: +、-: 分别表示菌株为阳性或阴性反应; +_w: 为弱阳性。

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction; +_w: Weak positive reaction.

片球菌群、乳球菌群和肠球菌群。其中 14 株菌株都能在 10 °C、45 °C、pH 4.5、pH 9.0、6.5% NaCl 环境下生长, 部分菌株能从精氨酸中产生 NH₃, 大多数菌株能利用乳糖、果糖、甘露醇、半乳糖、蔗糖、麦芽糖等, 所以将 14 株菌株初步鉴定为肠球菌群(*Enterococcus*)。另外 IMAU60189 与片球菌属的生理生化性质相似, 初步鉴定为片球菌群(*Pediococcus*), IMAU60193 与乳酸球菌属的生理生化性质相类似, 所以初步鉴定为乳球菌群(*Lactococcus*)。

2.2 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析

为了进一步将菌株鉴定到种的水平, 对分离到的 16 株菌进行了 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析。从图 2 可以看出 Lane 1, Lane 12 与所选用耐久肠球菌的模式菌株处于不同的位

置, 而其它菌株的条带与模式菌株处于相同的位置。

2.3 变性梯度凝胶电泳分析结果

为了验证上述方法的准确性, 本试验又采用变性梯度凝胶电泳分析对 16 株菌株进行了鉴定。从图 3 可以看出 IMAU60193 (Lane 1), IMAU60189 (Lane 12) 的条带与参考菌株的条带不在同一位置, 而其他菌株的条带与参考菌株处于同一位置, 与 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析结果是一致的, 所以我们将银染后的凝胶不同位置的条带切割回收并对其进行测序。通过测序可知 Lane 1 的 IMAU60193 为乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), Lane 12 的 IMAU60189 为乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)。

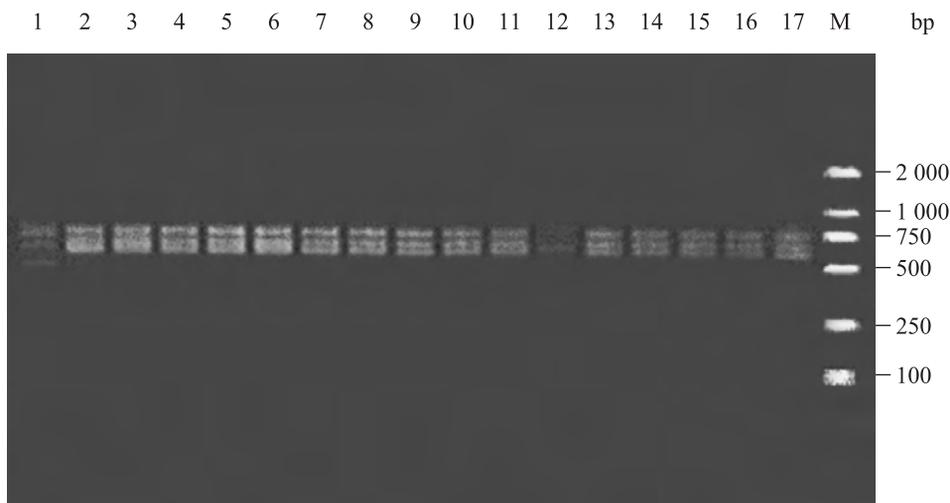


图1 参考菌株和待测菌株 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of 16S-23S rRNA ISRs PCR products of the reference strains and test strains

Note: 1: IMAU60193; 2: IMAU60172; 3: IMAU60190; 4: IMAU60179; 5: IMAU60182; 6: IMAU60181; 7: IMAU60191; 8: IMAU60186; 9: IMAU60173; 10: IMAU60184; 11: IMAU60183; 12: IMAU60189; 13: IMAU60185; 14: IMAU60174; 15: IMAU60192; 16: IMAU60175; 17: ATCC19432; M: DL2000 marker.

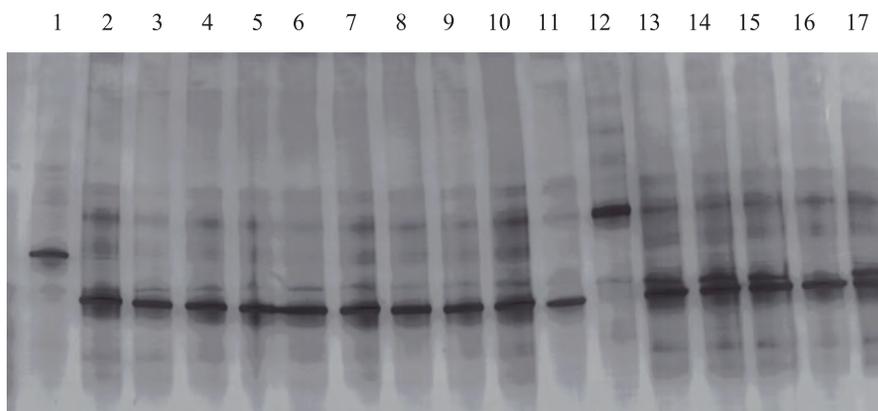


图2 参考菌株和待测菌株变性梯度凝胶电泳分析凝胶电泳图

Fig. 2 DGGE profiles of the reference strains and test strains

Note: 1: IMAU60193; 2: IMAU60172; 3: IMAU60190; 4: IMAU60179; 5: IMAU60182; 6: IMAU60181; 7: IMAU60191; 8: IMAU60186; 9: IMAU60173; 10: IMAU60184; 11: IMAU60183; 12: IMAU60189; 13: IMAU60185; 14: IMAU60174; 15: IMAU60192; 16: IMAU60175; 17: ATCC19432.

2.4 16S rRNA 基因序列分析

将试验中分离到的 16 株菌进行了 16S rRNA 基因测序, 测序结果在 GenBank 数据库中进行同源序列搜索(BLAST), 并采用软件构建系统发育树, 比较已测序菌株与模式菌株的亲缘关系, 如图 3 所示, 从图中可以看到 14 株分离菌株与耐久肠球菌的模式菌株亲源性较近, IMAU60193 与

Lactococcus lactis subsp. *lactis* 的模式株亲缘性较近, IMAU60189 与 *Pediococcus acidilactici* 的模式株亲缘关系较近。试验结果与 DGGE 测序结果相一致。

3 讨论

藏灵菇的多种保健作用, 如藏灵菇具有抗炎

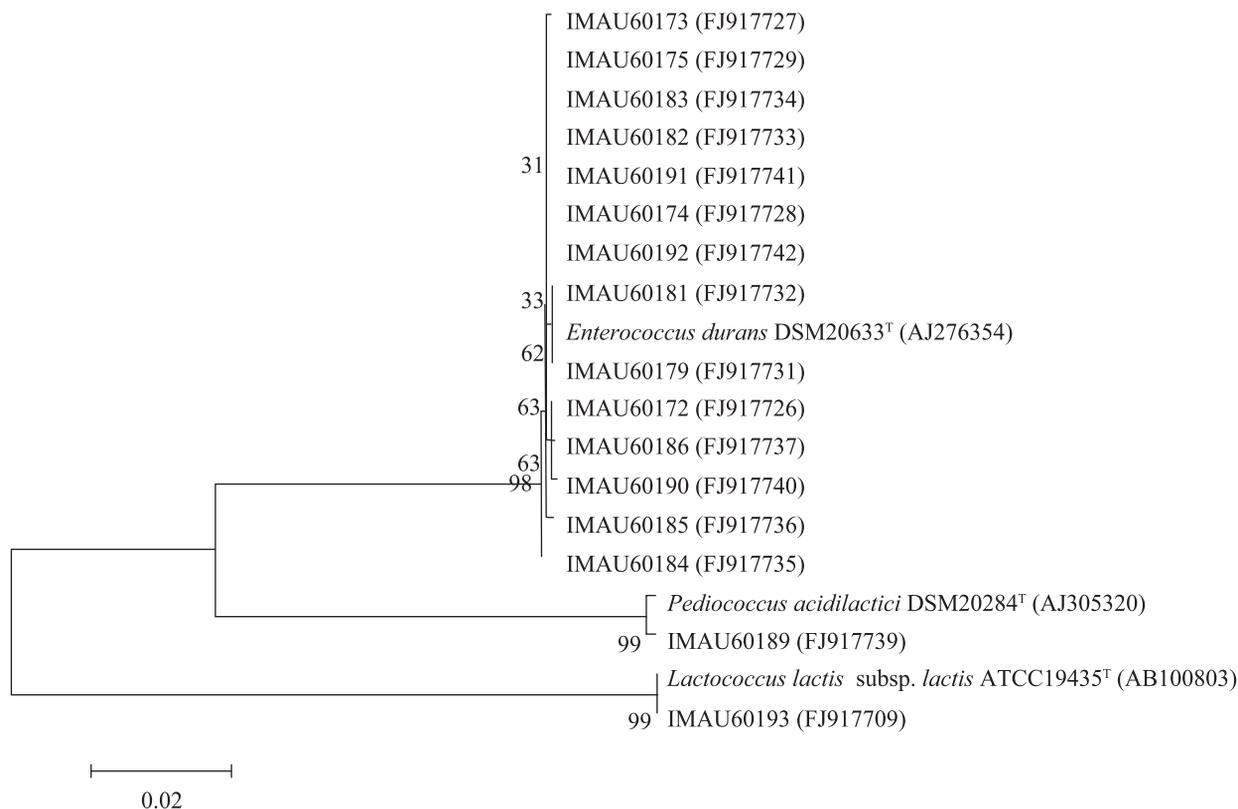


图3 参考菌株与待测菌株的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of Reference strains and *Lactococcus* strains based on 16S rDNA

症作用^[17], 藏灵菇奶对慢性肠道疾病功能调节作用^[18], 所以目前国内外对其微生物组成进行了一定的研究, 藏灵菇中菌系十分复杂, 但主要菌种为乳酸球菌、乳酸杆菌、醋酸菌和酵母菌, 这些菌株相互依存在藏灵菇中形成了共生体系。而对藏灵菇中微生物的分离鉴定还是主要采用了传统的生理生化试验, 但是由于藏灵菇中微生物菌群的复杂性, 仅用传统的方法还是无法准确地分析藏灵菇中微生物的结构, 因此在本次试验中我们采用了多项分类方法对藏灵菇中的乳酸球菌进行了鉴定, 从而有效地弥补了传统方法的缺陷, 更准确的对其进行了鉴定。

本试验主要对西藏雪莲中的乳酸球菌进行了分离, 从 2 份样品中分离得到了 14 株耐久肠球菌、1 株乳酸片球菌、1 株乳酸乳球菌乳酸亚种,

从试验结果可以看出耐久肠球菌是藏灵菇中的优势菌株, 在相关的文献中还未发现类似的报道, 其他 2 菌株与相关文献报道基本相同, 表明不同来源的藏灵菇中优势菌群种类可能存在差异。肠球菌为革兰氏阳性球菌, 是一种条件致病菌, 可引起心内膜炎、菌血症、尿道感染等疾病, 且具有抗生素抗性。但是一些能产生细菌素的肠球菌却可以作为益生菌应用于人们的日常生活中^[19], 作为一种食品中常见的乳酸菌, 在肉制品和其他发酵食品中也可能起着重要作用。安全性是肠球菌应用中的首要问题, 因此采用不同的方法准确鉴定耐久肠球菌在日常生活中有着重要的意义。

由于耐久肠球菌的鉴定具有实际意义, 所以选用准确的方法就尤为重要, 目前还是主要应用

传统的分离纯化鉴定方法,需要进行一系列繁杂的形态特征和生理生化试验,却不能对分离物进行精确的鉴定,不能反映分离物间的系统发育关系^[20-22],所以本试验主要采用了传统的鉴定方法和不同的分子生物方法相结合的多项分离鉴定方法对藏灵菇中的乳酸球菌进行了鉴定。从本次试验结果中可知传统的生理生化试验可以将分离到的菌株鉴定到菌群的水平,由于一个菌群中包含了多个种和亚种,其中有些种和种之间,种和亚种之间的一些生理生化性质也很相似,所以仅根据一些生理生化性质我们无法准确的鉴定到种的水平,甚至是亚种的水平,而 rRNA 是研究细菌进化和亲缘关系的重要指标,它含量大(约占细菌 RNA 总量的 80%),并存在于所有细菌中,而且 16S rRNA 序列分析已经成为细菌种属鉴定和分类的标准方法,大约 2 500 个种的 16S rRNA 全序列已经被报。而且 rRNA 基因序列既具有保守性,又具有高变性,是目前细菌分类和鉴定中经常测定的序列。其中 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析、DGGE、16S rRNA 序列分析作为近几年主要的分子生物方法,这些分子生物方法可以很好地解决传统的生理生化试验无法准确鉴定到种的水平的缺陷。从 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析、DGGE 电泳条带中可以看到这两种方法能有效快速的将 16 株菌株区分成 3 个不同的种,并通过 16S rRNA 基因测序最终将 16 株菌株全部准确的鉴定到种的水平。因此传统的生理生化试验并不能作为菌种分离鉴定的主要方法,而 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析、变性梯度凝胶电泳(DGGE)和 16S rRNA 基因测序可适用于藏灵菇中乳酸球菌菌种之间的鉴定。

藏灵菇可以作为天然发酵剂使牛奶变成酸奶,这种发酵剂含有多种乳酸菌和酵母菌,本文应用传统生理生化和多种分子生物学方法相结合的惰性分类手段对藏灵菇中的乳酸球菌进行

了准确鉴定和全面、可靠的研究,为研究和开发天然菌种发酵剂的乳酸菌资源奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] 刘变芳,孔庆学,郭蔼光.自然发酵剂“西藏雪莲”的初步研究与菌种鉴定[J].中国酿造,2004,11(11):11-13.
- [2] 刘宇峰,王金英,曲晓军,等.西藏灵菇菌的菌细菌学的研究[J].中国乳品工业,2005,33(9):35-39.
- [3] 杨宝兰,郑明珠.开菲尔粒在牛乳中的发酵特性研究[J].中国医学检验杂志,2004,5(4):308-309.
- [4] 刘冬梅,李理,梁世中,等.鼠李糖乳杆菌的抑菌及其在大豆奶酪中性质研究[J].现代食品科技,2005,21(4):6-10.
- [5] 周剑忠,董明盛,江汉湖.PCR-DGGE指纹技术与分离技术结合筛选藏灵菇奶发酵过程的优势菌[J].中国农业科学,2006,39(8):1632-1638.
- [6] 李剑,周剑忠,孙宇辉,等.藏灵菇中有益微生物的分离与鉴定[J].江苏农业科学,2009(1):242-244.
- [7] 肖琳琳,董明盛.干酪乳杆菌KM-16的筛选及其降胆固醇活性研究[J].中国乳品工业,2003,31(6):7-10.
- [8] 刘变芳,樊明涛,金丹.“西藏雪莲”中乳酸菌的分离鉴定及发酵性能研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(11):83-86.
- [9] 凌代文,东秀珠.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999:85-102.
- [10] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [11] Buchanan RE, Gibbons NE.伯杰氏细菌鉴定手册[M].洪俊华,译.北京:科学出版社,1986.
- [12] 乌日娜,张和平,孟和毕力格.酸马奶中乳杆菌 *Lb. casei*. Zhang和ZL12-1的16S rDNA基因序列及聚类分析[J].中国乳品工业,2005,33(6):4-9.
- [13] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling

- of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695–700.
- [14] 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE技术及其在微生物分子生态学中的应用[J]. *微生物学报*, 2004, 44(6): 845–848.
- [15] Drahovská H, Kocincová D, Seman M, et al. PCR-based methods for identification of *Enterococcus* species[J]. *Folia Microbiologica*, 2002, 47(6): 649–653.
- [16] Pangallo D, Drahovska H, Harichova J, et al. Evaluation of different PCR-based approaches for the identification and typing of environmental enterococci[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2008, 93(1/2): 193–203.
- [17] Diniz RO, Garla LK, Schneedorf JC, et al. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix[J]. *Pharmacological Research*, 2003, 47(1): 49–52.
- [18] 李永奇. 藏灵菇奶对慢性肠道疾病功能调节作用的临床观察[J]. *河南中医*, 2005, 25(3): 41–42.
- [19] 伍先绍, 贺稚非, 陈卫良. 肠球菌素及其产生菌株在食品工业中的研究和应用现状[J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(11): 111–116.
- [20] Amnan RI, Ludwig W, Sehleiefr K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1): 143–169.
- [21] Hugenholtz P, Goebbel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(18): 4765–4774.
- [22] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. *Science*, 1997, 276(5313): 734–740.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。