

传统分离培养结合 DGGE 法检测榨菜腌制过程的细菌多样性

李正国^{1*} 付晓红¹ 邓伟¹ 杨迎伍¹ 崔英双² 赵平²

(1. 重庆大学生物工程学院基因工程研究中心 重庆市高校功能基因与调控新技术重点实验室 重庆 400044)
(2. 重庆涪陵榨菜(集团)有限公司 重庆 408000)

摘要: 采用传统分离培养和基于 16S rRNA 作为分子标记的变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)的方法, 分析榨菜腌制过程中不同时期的可培养细菌数量、多样性及其群落结构。结果表明, 用传统分离与分子鉴定方法获得 7 个属的细菌类群, 其中乳杆菌属(*Acidobacterium*)是优势菌群, 明串珠菌属(*Leuconostoc*)是次优势菌群。对通过 DGGE 方法得到的 11 条 16S rRNA 优势条带序列进行了比对, 结果表明明串珠菌属(*Leuconostoc*)的丰度最高, 是腌制过程中主要的优势菌群, 乳球菌(*Lactococcus lactis*)是次优势菌。传统分离法与 DGGE 法结合能够更有效的分析榨菜腌制过程中微生物的多样性及其动态变化, 获得更全面的微生物多样性信息。

关键词: 榨菜(*Brassica juncea coss var. tsatsai*), 16S rRNA, 传统分离培养, 变性梯度凝胶电泳(DGGE), 群落多样性

Analysis of Bacterial Diversity During the Processing of *Brassica juncea coss var. tsatsai* by the Culture-independent and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) Methods

LI Zheng-Guo^{1*} FU Xiao-Hong¹ DENG Wei¹ YANG Ying-Wu¹
CUI Ying-Shuang² ZHAO Ping²

(1. Genetic Engineering Research Center, Bio-Engineering College, Chongqing University, Key Lab of Functional Gene and New Regulation Technologies under Chongqing Municipal Education Commission, Chongqing 400044, China)
(2. Chongqing Fuling Zhacai Group Ltd., Chongqing 408000, China)

Abstract: Both culture-dependent and culture-independent methods, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) based on the sequence of 16S rRNA V3 region gene, were used to examine the total bacteria counts, bacterial diversity and community structure of different periods *Brassica juncea* saline water samples. The results showed that 7 genera of bacteria were identified from 19 isolated bacterial populations by the traditional isolation method, the dominant bacteria in intestine belonged to *Acidobacterium*. By 16S rRNA V3 region gene DGGE method, 11 distinct bands were obtained from 16S rDNA amplifications. The profile of DGGE fingerprints of different periods saline water revealed that the most dominant bacteria group was

基金项目: 重庆市科委自然科学基金重点项目(No. CSTC 2007BA1005)

* 通讯作者: Tel: 86-23-65120483; Fax: 86-23-65120483; ✉ zhengguoli@cqu.edu.cn

收稿日期: 2008-09-19; 接受日期: 2008-12-08

Leuconostoc in the process of the fermentation. This suggested that a combination of molecular and traditional culture methods can be used to analyze and monitor the diversity of the process of fermentation microflora effectively, and that will give us more information of microorganism diversity.

Keywords: *Brassica juncea* var. *tsatsai*, Microbial diversity, Traditionally isolation culture, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), 16S rRNA

榨菜(*Brassica juncea* *coss* var. *tsatsai*)是中国特产,属于世界3大酱菜之一,与欧洲酸黄瓜、西德甜酸甘蓝一道享誉海内外,深受人们的喜爱。榨菜作为一种独特的乳酸发酵蔬菜制品,在中国有着悠久的历史,同时也是重庆的优势农业产业之一,近年来得到了迅速的发展。

榨菜腌制工艺的重要环节是榨菜后熟过程,而榨菜后熟的实质是微生物的发酵和风味形成。由于地缘因素,国外学者对中国榨菜的认识很少,国内少量研究主要集中在榨菜的生理^[1]、品种改良^[2,3]等方面,而对榨菜腌制加工过程中微生物群落的研究鲜有报道。只有少量采用传统微生物学方法对榨菜腌制过程中的腐败菌进行了分离、鉴定^[4,5],而对榨菜盐水中微生物区系构成的一些研究主要是对静态的考察,因此对于揭示榨菜腌制过程中微生物区系的多样性有很大的局限性。随着分子生物学技术的发展,食品微生物的分子生物学研究进入了一个新阶段,人们对于微生物在分子和基因水平的认识不断深入。16S rRNA存在于所有的原核生物中,被广泛用于细菌的系统学研究,是细菌种类鉴定的一个重要指标,特别是利用核糖体 16S rRNA 作为分子标记的变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术为不可培养微生物的分析提供了有力手段,已经广泛地应用于到环境和食品(包括腌制蔬菜)微生物的研究中^[6,7]。

榨菜虽然加工历史悠久,但对腌制过程中各时期的微生物群落变化尚缺乏研究。仅杨王君^[8]等通过传统微生物培养法,对四川榨菜后熟期间的微生物种类进行了一定的分析,但各腌制时期的微生物群落的变化规律仍不明确。本研究采用分子生物学方法和常规传统方法相结合,探讨微生物的动态变化过程,进一步揭示榨菜腌制过程中优势菌群组成,为明确榨菜后熟机制、质量控制和工艺改进提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 原料:青菜头购于重庆市场,将青菜头进行

修剪后,按传统加工方法加盐在室温下进行腌制,60 d 左右基本成熟。

1.1.2 主要试剂和仪器:细菌生化鉴定管(杭州天和微生物试剂有限公司,中国);DNA 纯化试剂盒、LATAq 酶(Bioflux, Japan);pMD-18T(TaKaRa, Japan);引物合成(上海生工生物技术公司,中国);UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物技术公司,中国);DGGE 电泳分析系(Bio-Rad, USA),PCR 仪(Bio-Rad, USA),高速冷冻离心机(Beckman, Germany),核酸测定仪(Beckman, Germany)。

1.2 取样

用无菌取样瓶取各时期榨菜盐水 1 mL~2 mL,采用血球计数板计数法进行各时期菌数测定;pH 测定采用 DELTA320 pH 计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)^[9]。

1.3 微生物分离鉴定

1.3.1 分离、纯化流程:盐水样品采集 稀释 培养 平板划线分离 鉴定。以无菌生理盐水逐级稀释样品至 10^{-8} ,取 10^{-1} ~ 10^{-8} 稀释液各 0.1 mL,在不同的培养基(LB、PDA、MRS 及查氏)平皿上涂布接种,于 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h。所有处理均重复 3 次。然后挑取单菌落,在分离培养基上多次划线分离纯化、镜检,得到纯菌株。

1.3.2 形态学和生理生化特性鉴定:根据《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版^[10]及《常见细菌系统鉴定手册》^[11]对所得的优势菌群进行形态和生理生化测定,并按可数性原则对每个平板上的典型目标菌落进行计数,不同菌落与总菌落数的比例为每种菌属的相对丰度。

1.4 细菌 DGGE 分析

1.4.1 总 DNA 的提取:取盐水样品约 200 mL,用无菌纱布过滤。10000 g 离心 5 min,去上清,沉淀用 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取总 DNA。DNA 浓度用核酸测定仪测定。

1.4.2 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增:以提取的盐水细菌总 DNA 为模板,用细菌通用引物:P1:

357f-GC(5'-GC-clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')及 P2 :518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')进行扩增, 上游引物 P1 5'端有 40 bp GC 夹(CGCCCGC CGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGG GG)。为减少非特异性扩增, 采用降落 PCR 进行扩增。反应体系 25 μ L, 反应条件 :94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 65 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 每两个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C, 当退火温度降至 55 $^{\circ}$ C 后, 再以该温度扩增 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。所得产物于 2%的琼脂糖凝胶上电泳。

1.4.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)和产物分析:上述 PCR 产物浓缩后, 采用 DGGE 分析系统进行电泳分离, 8%(W/V)的聚丙烯酰胺(37.5 :1, W/W), 以变性剂尿素与甲酰胺线性梯度范围为 35%~45%。60 $^{\circ}$ C 恒温, 80 V 16 h, EB 染色 15 min~25 min, Versa Doc 2000 凝胶成像系统拍照, 标记 DGGE 图谱中清晰的优势条带后割胶, 捣碎后加入 30 μ L Sterilized ddH₂O, -20 $^{\circ}$ C 浸泡过夜, 离心取上清作为模板进行 PCR 扩增, 引物为带 GC 夹的 P1 和 P2。PCR 反应程序同 1.4.2 所述。得到的 PCR 扩增产物再以 DGGE 分离。PCR 产物用纯化试剂盒(Bioflux) 纯化后与载体 pMD18-T 连接, 转化到 *E. coli* JM109 中, 用菌落 PCR 方法检测阳性克隆。阳性克隆子送上海生工生物技术公司进行测序。测序结果于 NCBI 上进行比对分析。条带所代表的优势菌属的相对丰度用每个条带荧光强度与所在泳道所有条带荧光总强度之比来表示。

2 结果和分析

2.1 微生物数量及 pH 变化

随着发酵过程的进行, 微生物数量种类及 pH 值也相应的发生变化。经过 3 次加盐工艺后, 盐度明显增高, 但是 pH 值却有所下降, 从开始的 6.95 下降至 4.12, 并维持这一水平(图 1A)。微生物总量经历了一个先急速增加到逐渐趋缓, 并稳定在一定数量的过程, 其变化可以大致分为 3 个时期, 0~12 d 的稳定期, 12 d~30 d 的快速生长期以及 30 d~60 d 的下降至平衡时期(图 1B)。

2.2 可培养优势菌群的分离鉴定

从 4 种培养基上共获得 34 个单菌落, 从中筛选出 19 个优势单菌落, 并对这 19 个菌落进行常规的形态学鉴定, 并进行进一步的生理生化实验, 结果

表明(表 1、2): 菌株 B-01、B-09、B-14、B-17 符合明串珠菌属(*Leuconostoc*)特征; B-02、B-03、B-18 具片球菌属(*Pediococcus*)特征; 菌株 B-04、B-19 符合葡萄球菌属特征(*Staphylococcus*); 菌株 B-05、B-08、B-12、B-15 符合乳杆菌属(*Acidobacterium*)特征; 菌株 B-06、B-11 符合链球菌属(*Streptococcus*)特征; 菌株 B-07 符合醋酸杆菌属(*Acetobacter*)特征; 菌株 B-10、B-13、B-16 符合芽孢杆菌属(*Bacillus*)特征。

其中菌株 B-05、B-08、B-12 与总菌落数的比例最高, 其次是菌株 B-01 和 B-17, 通过传统分离方法得到, 乳杆菌属(*Acidobacterium*)是榨菜腌制过程中的最主要优势菌群, 明串珠菌属(*Leuconostoc*)是次优势菌群。这 19 株菌均可在 42 $^{\circ}$ C 生长, 但在最适生长温度 15 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C; 最适生长 pH 5.0~7.5; NaCl 浓度 7%~8%条件下生长良好。

2.3 细菌总 DNA 的扩增产物变性梯度凝胶电泳(DGGE)图谱分析

DGGE 是一种相对快速准确的检测细菌群落的指纹技术。根据 DGGE 的原理, 每一个条带大致与群落中的一个优势菌群或操作分类单位(Operational taxonomic unit, OTU) 相对应^[12]。对榨菜腌制过程中不同时期盐水样品细菌的 DGGE 分析图谱见图 2。结果表明, 不同时期的盐水样品 DGGE 图谱存在一定的差异。为了进一步分析榨菜腌制过程中微生物的群落结构和多样性, 我们对图 2 中标记的 11 条较明显的条带进行了割胶回收、测序。在不同时期的盐水样品中都出现一条明显的共有条带(标记为 a), 这条优势主带并不随着腌制时期的变化而发生改变, 测序结果表明条带 a 是明串珠菌属(*Leuconostoc*)。图谱显示, 榨菜腌制过程可以大致分为前期(0~7 d)、中期(12 d~25 d)、后期(30 d~60 d)。中期微生物变化最激烈, 这也与微生物数量测定结果一致, 而且用 DGGE 方法得到的细菌种群明显多于可培养方法获得的。

通过分析发现(表 3), 榨菜细菌 16S rDNA V3 区间的序列与现有的数据库中的细菌序列有很高的相似性, 都在 97%以上, 对分离得到的 11 条优势条带测序结果显示, 优势细菌主要属于 *Leu citreum*、*Lactobacillus brevis*、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*。明串珠菌属的丰度最高, 是腌制过程中主要的优势菌群, 乳球菌是次优势菌。在 DGGE 图谱中, 明串珠菌属一开始就存在, 而在发酵初期, 第 1 至第 4

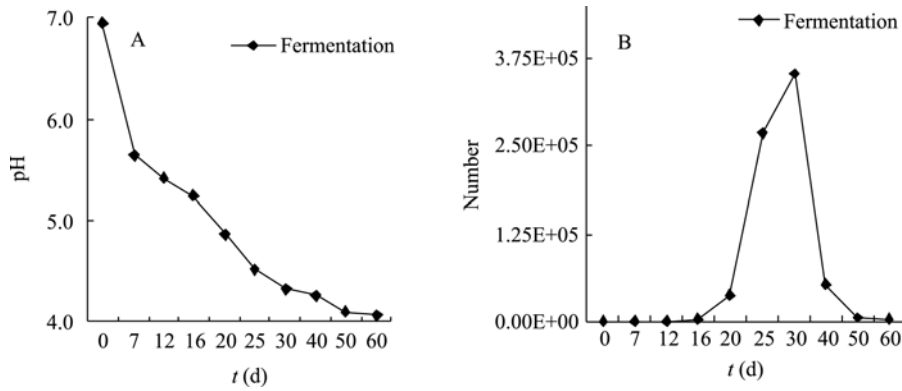


图 1 榨菜加工过程中 pH 值和微生物数量的变化
Fig. 1 The change of pH and total microorganism during the processing of *Brassica juncea*

天, 生长繁殖的速度非常快, 成为优势菌。但由于乳酸细菌的发酵作用, 酸度增加, pH 值不断下降, 明串珠菌(条带 a)等受到抑制, 生长趋缓并逐渐稳定。之后在发酵中期, 第 12 至第 25 天, 乳酸细菌(条带 c、i、j) 开始迅速繁殖成为优势菌, 继续发酵, 酸度进一步增加。直到发酵后期, 第 40 天, 由于 pH 降至 4.5 以下, 酸度较高, 乳酸菌也受到抑制, 细菌总量下降很多。这时榨菜已基本成熟, 色泽、风味与成熟样品无异。

分子鉴定方法与传统培养方法得到榨菜优势微

生物菌群有一定差异, 两种方法得到的第一优势菌

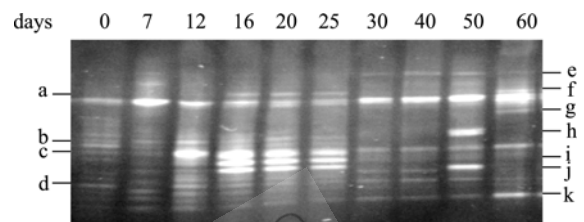


图 2 榨菜不同时期盐水样品优势细菌的 DGGE 图谱分析
Fig. 2 DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA fragments from microflora of *Brassica juncea*

表 1 生化实验项目测定
Table 1 Biochemical characteristics of bacteria

菌株 Strains	氧化酶 Oxidase	接触酶 Catalase	明胶液化 Gelatin liquefaction	淀粉水解 Amylolytic	甲基红 V-I	石蕊牛奶 Litmus milk	吲哚 Indole	硝酸还原 Nitric acid recovery
B-0	-	-	-	-	+	as	-	-
B-0	-	-	-	-	+	o	-	-
B-0	-	-	-	-	+	as	-	-
B-0	-	-	-	-	+	as	-	-
B-0	-	-	-	-	-	as	-	-
B-0	-	+	-	-	-	as	-	-
B-0	-	-	-	-	+	as	-	-
B-0	-	-	-	-	+	as	-	-
B-0	-	-	-	-	+	as	-	-
B-1	-	+	+	+	+	a	-	+
B-1	-	-	-	-	+	as	-	-
B-1	-	-	-	-	+	as	-	-
B-1	-	+	+	+	+	a	-	+
B-1	-	-	-	-	+	as	-	-
B-1	-	-	-	-	+	as	-	-
B-1	-	+	+	+	+	a	-	+
B-1	-	-	-	-	+	as	-	-
B-1	-	-	-	-	+	o	-	-
B-1	-	-	-	-	+	as	-	-

表 2 糖发酵试验
Table 2 Fermentation of sugar of bacteria

菌株 Strains	B-01	B-02	B-03	B-04	B-05	B-06	B-07	B-08	B-09	B-10	B-11	B-12	B-13	B-14	B-15	B-16	B-17	B-18	B-19
葡萄糖 Glucose	ag	a	a	a	ag	ag	ag	ag	ag	a	ag	ag	a	ag	ag	a	ag	a	a
核糖 Ribose	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
半乳糖 Galactose	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
果糖 Fructose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
山梨糖 Sorbitose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
枸橼酸盐 Citrate	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
木糖 Xylose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇 Mannitol	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
棉籽糖 Raffinose	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
鼠李糖 Rhamnose	+	-	-	-	+	-	d	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
初步鉴定 Identification	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Acidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Acidobacterium</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Acidobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Acidobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应; a: 产酸反应; g: 产气反应; o: 可变反应; s: 凝结反应; d: 延迟反应。

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction; a: Acid reaction; g: Gas reaction; o: Variable reaction; s: Solidify reaction; d: Delayed reaction.

表 3 榨菜细菌 DGGE 回收条带比对结果
Table 3 Identity of bands obtained from DGGE analysis of *Brassica juncea* bacterial communities

条带 Bands ^a	菌株 Closest relative	相似性(%) Identity ^b	编号 Accession no.
a	<i>Leu citreum</i>	100	DQ489736
b	Uncultured eubacteria	100	EU468438
c	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	EU755262
d	Uncultured eubacteria	98	DQ81014
e	Uncultured eubacteria	97	EU468391
f	<i>Psychrobacter</i>	100	EF474162
g	Uncultured eubacteria	99	EU468410
h	<i>W. confuse</i>	100	AY281294
i	<i>Lactobacillus brevis</i>	100	EU744192
j	<i>Lactobacillus curvatus</i>	100	EU621984
k	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100	AB375442

注: a: 表 3 条带为割胶所得; b: 条带系列与基因库中系列的相似性。

Note: a: Bands as shown in Fig. 3 were excised from DGGE gel; b: Percentage of identical nucleotides in sequences retrieved from DGGE gel, and sequences of closest relative found in GenBank.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

不同,用分子生物学方法获得较多相对丰度高的优势菌多是不可培养的细菌,而用传统方法获得的总菌落数的比例最高优势菌在分子生物学检测中大多为低丰度细菌。但两种方法都验证了乳酸类细菌在腌制发酵过程中的优势地位,进一步说明乳酸细菌在榨菜腌制成熟中的重要作用。

3 讨论

利用分子生物学方法(DGGE)和传统分离培养法对榨菜腌制过程中微生物区系的多样性分析结果表明,微生物发酵在榨菜的腌制成熟过程中具有十分重要的作用。

两种分析方法中都检测到相当高丰度的明串珠菌属。明串珠菌属是酱腌菜、发酵乳制品、果酒中常见发酵菌种,可发酵柠檬酸而产生特征风味物质,且大蒜、茴香、生姜、辣椒等食品添加香辛料对蔬菜发酵过程中的肠膜明串珠菌有促生长作用^[13]。DGGE 图谱中的次优势菌乳球菌,也是泡菜及腌制菜的重要发酵菌^[14],对风味品质的形成具有重要作用。在传统分离培养中发现,榨菜盐水环境下可培养的第一优势细菌是乳杆菌属,研究证明乳酸杆菌^[15]和酵母菌能在发酵环境中协同作用,相互促进,共同推动发酵过程,有利于风味物质的形成。这些乳酸类细菌的分离、鉴定,对于榨菜腌制工艺的改进具有重要的作用,可进一步作为发酵启动剂,应用于榨菜加工中,将大大缩短腌制时间,并形成营养价值更高、风味更好的成品。

在分子生物学方法中鉴定获得嗜冷杆菌(条带 f),及相对较高丰度的不可培养菌。嗜冷杆菌污染是现代乳制品加工过程中最常见的问题,导致乳及乳制品风味、品质降低,缩短保质期,从而影响产品的质量及加工过程。在榨菜腌制过程的中后期出现了低丰度的嗜冷杆菌,可能是腌制加工过程中出现了污染。因此,在榨菜腌制过程防止污染,对提高腌制成品品质,具有十分重要的意义。而这些菌在传统培养方法中都未曾检出,表明只有那些适合培养基条件及培养温度的细菌才能从传统方法中分离出来。因此,采用 DGGE 指纹图谱更全面、更真实地反映食品样品中微生物群落的结构和多样性。

基于 16S rRNA 的 PCR-DGGE 技术为我们提供了一条快速揭示传统食品微生物区系组成的有效途径。运用 PCR-DGGE 基因指纹图谱技术分析榨菜

的微生物群落结构,研究传统食品发酵功能微生物的生态特征与规律,将其与传统的菌种分离鉴定相结合,对判断和鉴定榨菜生产中与特征风味物质相关的关键微生物、指导生产工艺改进,具有重要的理论和实践意义。

参考文献

- [1] Morra MJ, Kirkegaard JA. Isothiocyanate release from soil-incorporated Brassica tissues. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, **34**: 1683-1690.
- [2] Ahmad A, Abdin MZ. NADH: nitrate reductase and NAD(P)H: nitrate reductase activities in mustard seedlings. *Plant Science*, 1999, **143**: 1-8.
- [3] Rafael F, Mercedes RC, Antonio HB. The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Industrial Crops and Products*, 2006, **24**: 307-313.
- [4] 王敏,张耀相,肖翔.高盐酱腌菜坯致腐微生物的分离鉴定. *中国调味品*, 2003, **5**: 19-26.
- [5] 李学贵.对腌渍榨菜酸败变质的探讨. *中国调味品*, 2004, **3**: 31-32.
- [6] Temmerman R, Scheirlinck L, Huys G, et al. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(1): 220-226.
- [7] Fasoli S, Marzotto M, Rizzotti L, et al. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int Food Microbiol*, 2003, **82**(1): 59-70.
- [8] 杨王君,吴永娴,曾凡坤.四川榨菜后熟时期微生物区系的研究. *农牧产品开发*, 1999, **10**: 22-23.
- [9] 张庆芳,迟乃玉,郑燕,等.乳酸菌降解亚硝酸盐机理的研究. *食品与发酵工业*, 2002, **28**(8): 27-31.
- [10] John GH, Nobel RK, Peter HA, et al. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Press, 1994, pp.97-116.
- [11] 东秀珠,蔡妙英,王宝玲,等.常见细菌系统鉴定手册.第一版.北京:科学出版社,2001, pp.216-635.
- [12] 刘炜,马晓军,侯书贵,等.东天山地区庙儿沟雪坑中微生物多样性、群落结构与环境关系研究. *微生物学报*, 2007, **47**(6): 1019-1026.
- [13] 李文斌,宋敏丽,高荣琨.肠膜明串珠菌的研究和应用进展. *食品工程*, 2006, **4**: 3-11.
- [14] 周光燕,张小平,钟凯,等.乳酸菌对泡菜发酵过程中亚硝酸盐含量变化及泡菜品质的影响研究. *西南农业学报*, 2006, **19**(2): 290-293.
- [15] 毛青钟.论黄酒发酵过程酵母和乳酸杆菌协同作用关系. *山东食品发酵*, 2006, **1**: 29-31.