

食品检验中乳酸菌鉴定方法的探讨

蒋波, 房蕊, 刘冬玲, 刘浩, 杨美成*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: **目的** 评价 GB 4789《食品安全国家标准 食品微生物学检验》中乳酸菌的鉴定方法。**方法** 选择 5 种双歧杆菌、4 种乳酸杆菌和 1 种链球菌共 10 株乳酸菌, 分别采用 GB 4789 标准中的方法、API 生化鉴定系统、16S rRNA 基因序列分析法和 RiboPrinter 全自动基因指纹图谱分析法进行鉴定。**结果** GB 4789 对乳酸杆菌和嗜热链球菌鉴定效果较好, 对双歧杆菌的鉴定能力较弱; API 鉴定乳酸菌一般至“属”水平; 16S rRNA 序列分析和 RiboPrinter 系统可鉴定乳酸菌至“种”水平, 婴儿双歧杆菌的鉴定结果为长双歧杆菌婴儿亚种。**结论** 建议 GB 4789 标准中增加分子生物学方法作为乳酸菌鉴定方法的补充, 同时建议及时更新标准中菌株的分类和名称。

关键词: 食品微生物学检验; 乳酸菌; 鉴定方法

Identification methods of lactic acid bacteria in food test

JIANG Bo, FANG Rui, LIU Dong-Ling, LIU Hao, YANG Mei-Cheng*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the identification methods of lactic acid bacteria in GB 4789 *Food Microbiological Examination*. **Methods** Ten strains including 5 strains of *Bifidobacterium* spp., 4 strains of *Lactobacillus* spp. and 1 strain of *Streptococcus* spp. were identified by conventional biochemical tests of the national food safety standard, API biochemical system, 16S rRNA sequence analysis and RiboPrinter automatic microbiological gene fingerprint system, respectively. **Results** Conventional biochemical tests of the standard identified strains with good results of *Bifidobacterium* and *Streptococcus* rather than *Lactobacillus*. API identified strains to the genus level. Both 16S rRNA and RiboPrinter identified strains to the species level and classified *Bifidobacterium infantis* as *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. **Conclusion** Molecular method is proposed as a complementary method for identification of lactic acid bacteria in GB 4789. Meanwhile, name and classification of the strains in GB 4789 should be updated timely and accurately.

KEY WORDS: food microbiological examination; lactic acid bacteria; identification method

1 引言

乳酸菌是一类可发酵糖主要产生乳酸的细菌的通称, GB 4789《食品微生物学检验》^[1]标准中明确乳酸菌主要为乳杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)和链

球菌属(*Streptococcus*)。目前多种乳酸菌已广泛应用于婴幼儿配方食品、保健食品、药品的生产中^[2]。许多种乳酸菌都具有有益功能, 我国国家卫生和计划生育委员会颁布的《可用于食品的菌种名单》^[3]和《可用于婴幼儿配方食品的菌种名单》^[4]均明确了乳酸菌的种名, 因此乳酸菌种水

*通讯作者: 杨美成, 博士, 主任药师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析与微生物学检验。E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

*Corresponding author: YANG Mei-Cheng, Ph.D., Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China. E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

平的分类和鉴定不仅是研究开发的重点,也将成为我国食品安全监管的必然需求。

乳酸菌的分类鉴定方法包括 2 大类:一类是生理生化方法,包括形态特征、生理生化反应等,这些方法都是基于微生物表面受体的特异性,至今仍在使用。另一类是分子生物学方法,即从分子和基因水平来认识乳酸菌的遗传结构、组成和分类,不同的基因型方法展示不同的分类水平,包括 DNA 探针杂交技术、分子标记技术和 PCR 扩增技术等^[5-8]。

本研究选取了 5 种双歧杆菌、4 种乳酸杆菌和 1 种链球菌共 10 株乳酸菌标准菌株,参照 GB 4789.34-2012《食品安全国家标准食品微生物学检验双歧杆菌的鉴定》^[9]和 GB 4789.35-2010《食品安全国家标准食品微生物学检验乳酸菌检验》^[10]进行生化鉴定,同时采用集成化的半自动生化鉴定系统 API 和基于分子生物学原理的 16S rRNA 基因序列和 RiboPrinter 全自动基因指纹图谱对 10 株菌株进行鉴定,比较分析现行有效的食品安全国家标准对乳酸菌鉴定的准确性,旨在为食品检测中乳酸菌种水平的结果判定和食品安全国家标准的完善提供技术依据和数据支持。

2 材料与方法

2.1 菌 种

实验用菌种包括两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*, CICC 6071)、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*, CICC 6069)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*, CICC 6068)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*, CICC 6079)、青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*, CICC 6070)、德氏乳杆菌保加利亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, CICC 6047)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*, CICC 6074)、罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*, CICC 6226)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*, CICC 6063),均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心;干酪乳杆菌干酪亚种(*Lactobacillus casei* subsp. *casei*, GIM 1.159),购自广东省微生物菌种保藏中心。

2.2 主要仪器和试剂

API 鉴定系统(法国生物梅里埃公司); Veritii PCR 扩增仪(美国 ABI 公司); Quantity One 紫外成像仪、电泳仪(美国 BioRad 公司); RiboPrinter 全自动微生物基因指纹鉴定系统(美国 Dupont 公司)。

API 50CHL 和 API 20A 板条购自法国生物梅里埃公司;生化管购自杭州滨和微生物试剂有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;rTaq DNA 聚合酶、PCR 缓冲体系及 DNA Marker,均购自大连宝生物工程有限公司;RP 相关耗材样品制备包购于美国杜邦公司;采用通用引物,正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3';反向引物 1492R: 5'-TACGGCTACCT

TGTTACGACTT-3'^[11],引物合成和 DNA 测序委托上海英骏生物技术有限公司完成。

2.3 实验方法

2.3.1 食品安全国家标准鉴定

挑选单菌落革兰染色镜检,并参照 GB 4789.34-2012《食品安全国家标准食品微生物学检验双歧杆菌的鉴定》^[9]和 GB 4789.35-2010《食品安全国家标准食品微生物学检验乳酸菌检验》^[10]中列出的乳酸菌主要生化反应指标对 10 株菌株进行鉴定(双歧杆菌的有机酸代谢产物采用气相色谱法测定)。

2.3.2 API 鉴定

选择 API 50 CHL 板条鉴定乳酸杆菌和嗜热链球菌,选择 API 20A 鉴定双歧杆菌,系统鉴定操作步骤严格按照仪器生产厂商提供的说明书进行。

2.3.3 16S rRNA 基因序列分析法鉴定

挑取单菌落,按 DNA 抽提试剂盒依照操作说明提取细菌基因组 DNA。

PCR 扩增反应体系体积为 50 μ L:上、下游引物各 200 pmol/L,模板 DNA 为 2 μ L,10 \times PCR 缓冲液(含 $MgCl_2$)为 5 μ L,dNTP 各 200 μ mol/L,5 U/ μ L rTaq 酶 0.25 μ L,无菌双蒸水补齐至 50 μ L。PCR 循环参数:100 $^{\circ}C$ 热盖;95 $^{\circ}C$ 持续变性 1 min;95 $^{\circ}C$ 变性 30 s,56 $^{\circ}C$ 退火 30 s,72 $^{\circ}C$ 延伸 90 s,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。取 PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶成像分析仪观察结果。

采用 Clustalw 软件分析测序结果,在 NCBI 网站 GenBank 数据库进行 BLAST 比对。

2.3.4 RiboPrinter 指纹图谱分析法鉴定

挑取单菌落悬浮于缓冲液中,95 $^{\circ}C$ 处理后,加入 5 μ L 裂解液 A 和裂解液 B,放置于 RiboPrinter 样品孔中并运行程序,限制性内切酶采用 EcoR I,相关操作流程参照仪器标准化操作规程,与 Dupont ID 数据库比对后得出结果。

3 结 果

3.1 食品安全国家标准鉴定结果

10 株菌株均为革兰阳性菌,无芽孢,其中乳酸杆菌和双歧杆菌为杆状,嗜热链球菌为球状,显微形态见图 1。

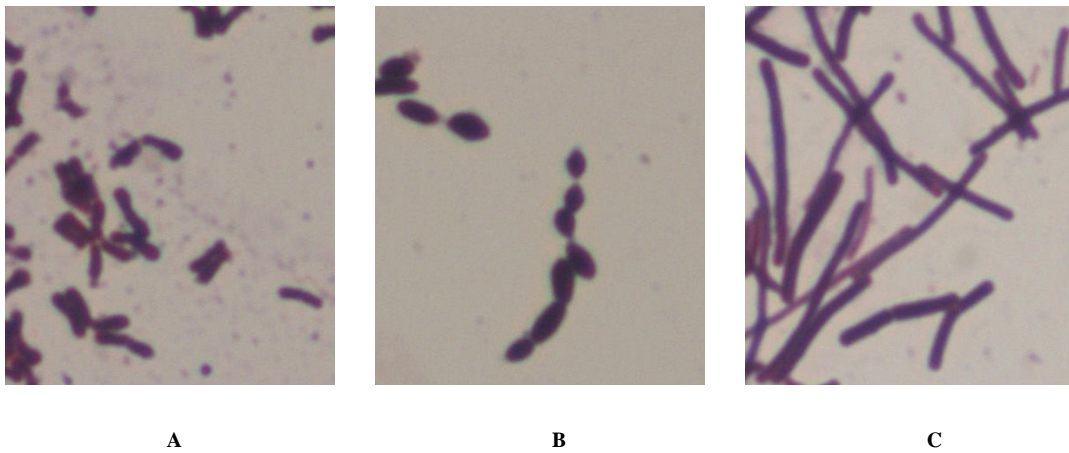
对 GB 4789 中列出的主要生化反应指标进行了至少 3 次平行试验,每个生化反应出现 2 次以上重复作为结果。乳酸杆菌和链球菌的生化反应结果中仅 1 个反应与 GB 4789.35-2010^[10]不一致:干酪乳杆菌干酪亚种 GIM 1.159 山梨醇反应为阴性,GB 4789.35-2010^[10]中该反应呈阳性,GIM 1.159 源自 ATCC 334,ATCC 334 的山梨醇反应为阴性^[12],因此该反应应判为阴性;另外 3 种乳酸杆菌和 1 种链球菌的生化反应结果与 GB 4789.35-2010^[10]中列出的结果完全一致(见表 1 和表 2)。双歧杆菌的生化反应结果与 GB 4789.34-2012^[9]差异较大,仅长双歧杆菌 CICC 6068 生

化反应结果与 GB 4789.35-2010^[10]中列出的结果完全一致(见表3)。

3.2 API 鉴定结果

经 API 50CHL 和板条 API 20A 鉴定, 2 种乳杆菌和 4 种双歧杆菌共 6 株菌株未能准确鉴定至“种”水平: 干酪乳杆菌干酪亚种 GIM1.159 鉴定为“类干酪乳杆菌干酪亚种”,

罗伊氏乳杆菌 CICC 6226 鉴定为“发酵乳杆菌”, 婴儿双歧杆菌 CICC6069、长双歧杆菌 CICC6068、短双歧杆菌 CICC6079 和青春双歧杆菌 CICC6070 均鉴定为“双歧杆菌 1”; 1 株双歧杆菌未能准确鉴定至“属”水平: 两歧双歧杆菌 CICC6071 鉴定为“内放线菌”; 其余 3 株菌株均准确鉴定至“种”水平(见表4)。



A: 青春双歧杆菌[CICC 6070]; B: 嗜热链球菌[CICC 6063]; C: 嗜酸乳杆菌[CICC 6074]
A: *Bifidobacterium adolescentis*[CICC 6070]; B: *Streptococcus thermophilus*[CICC 6063];
C: *Lactobacillus acidophilus*[CICC 6074]

图1 显微形态图

Fig.1 Microscopic morphology

表1 乳酸杆菌的生化反应结果
Table 1 Biochemical results of *Lactobacillus*

生化反应	干酪乳杆菌干酪亚种		德氏乳杆菌保加利亚种		嗜酸乳杆菌		罗伊氏乳杆菌	
	国标	GIM 1.159	国标	CICC 6047	国标	CICC 6074	国标	CICC 6226
七叶苷	+	+	-	-	+	+	ND	-
纤维二糖	+	+	-	-	+	+	-	-
麦芽糖	+	+	-	-	+	+	+	+
甘露醇	+	+	-	-	-	-	-	-
水杨苷	+	+	-	-	+	+	-	-
山梨醇	+	+	-	-	-	-	-	-
蔗糖	+	+	-	-	+	+	+	+
棉子糖	-	-	-	-	d	+	+	+

+表示阳性; -表示阴性; d 表示 11%~89%菌株阳性; ND 表示未测定

续表 3

生化反应	两歧双歧杆菌		婴儿双歧杆菌		长双歧杆菌		青春双歧杆菌		短双歧杆菌	
	国标	CICC 6071	国标	CICC 6069	国标	CICC 6068	国标	CICC 6070	国标	CICC 6079
水杨甙(柳醇)	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
D-纤维二糖	-	-	+	+	-	-	d	-	+	+
D-麦芽糖	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-蜜二糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-蔗糖	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-海藻糖(寡糖)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
菊糖(菊根粉)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
D-松三糖	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
D-棉籽糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
淀粉	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
肝糖(糖原)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
木糖醇	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
龙胆二糖	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
D-松二糖	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-来苏糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-塔格糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-岩糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-岩糖	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D-阿糖醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-阿糖醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖酸钠	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2-酮基-葡萄糖酸钠	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-酮基-葡萄糖酸钠	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+表示阳性; -表示阴性; d 表示 11%~89%菌株阳性; ND 表示未测定

表 4 乳酸菌的鉴定结果(API、16S rRNA 和 Riboprinter)
Table 4 Identification results of lactic acid bacteria (API, 16S rRNA and Riboprinter)

菌株编号	API		16S rRNA		Riboprinter	
	鉴定结果	%	鉴定结果	最大识别%	鉴定结果	相似度
GIM1.159	类干酪乳杆菌干酪亚种	99.8	<i>Lactobacillus casei</i>	99	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	0.88
CICC6047	德氏乳杆菌保加利亚亚种	96.2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	99	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0.89
CICC6074	嗜酸乳杆菌 1	98.3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	99	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.84
CICC6226	发酵乳杆菌 1	97.3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99	/	/
CICC6063	嗜热链球菌	99.2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	99	<i>Streptococcus thermophilus</i>	0.88
CICC6071	内放线菌	99.8	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	99	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0.90
CICC6069	双歧杆菌 1	99.8	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	99	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	0.94
CICC6068	双歧杆菌 1	99.4	<i>Bifidobacterium longum</i>	100	<i>Bifidobacterium longum</i>	0.95
CICC6079	双歧杆菌 1	91.2	<i>Bifidobacterium breve</i>	99	<i>Bifidobacterium breve</i>	0.95
CICC6070	双歧杆菌 1	98.4	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	99	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	0.85

4 结 论

GB 4789 中乳酸菌分类鉴定以形态学、生理生化等表型特征为主要指标, 操作过程中不需要特殊的仪器, 鉴定时成本较低且方便。但相同菌株培养条件的改变可能会引起结果发生变化, 不同菌株之间生理生化特征也存在差异, 这可能是乳酸菌尤其是双歧杆菌的生化反应结果不能完全符合 GB 4789.35-2012^[10]的原因之一, 以生理生化反应为依据的 API 系统也存在相同的缺点^[13,14], 本试验中鉴定乳酸菌一般至“属”水平。

分子生物学鉴定方法如 16S rRNA 基因序列分析法和 RiboPrinter 指纹图谱分析法, 依赖于 PCR 来选择性地扩增特殊目的 DNA 片段, 从而得到所需要的信息, 最大的优点是不依赖培养条件, 不会因为培养条件的变化而产生不同的结果, 同时还可以分型和溯源^[15-18]。本次试验虽未能将个别菌株鉴定至“种”或“亚种”水平, 但可将乳酸菌鉴定至“种”水平。

两种分子鉴定方法均将婴儿双歧杆菌 CICC6069 鉴定为“长双歧杆菌婴儿亚种”, 查阅文献婴儿双歧杆菌已经重新分类至长双歧杆菌, 通过 DNA-DNA 杂交 16S rDNA 及 hsp60 基因序列分析将长双歧杆菌划分为 3 个亚种长双歧杆菌长亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*)、长双歧杆菌婴儿亚种和长双歧杆菌猪亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *suis*)^[19-20]。GB 4789.34-2012^[9]中的菌种名称没能及时更正, 导致菌名的混淆, 也可能进而引起菌种的混乱。

本研究试验表明, GB4789 国家标准可有效鉴定乳酸杆菌和链球菌, 但是鉴定双歧杆菌的能力较弱, API 鉴定乳酸菌一般至“属”水平, 分子方法可鉴定至“种”水平。综合考虑各种方法的优缺点, 建议增加分子生物学鉴定方法作为 GB 4789 国家标准中现有乳酸菌鉴定方法的补充, 同时应对菌种的分类及时进行更新。

参考文献

- [1] GB 4789 食品安全国家标准食品微生物学检验[S]. GB 4789 National food safety standard- Food microbiological examination [S].
- [2] Prasad J, Gill H, Smart J, *et al.* Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics [J]. *Int Dairy J*, 1998, 8: 993-1002.
- [3] 卫生部办公厅关于印发《可用于食品的菌种名单》的通知[EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/sps/s3593/201004/65839d2d57554dd29ae40a52dca92c74.shtml>.2010-04-28. Notice of the general office of the ministry of health on issuing the “list of species can be used for food”[EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/sps/s3593/201004/65839d2d57554dd29ae40a52dca92c74.shtml>.2010-04-28.
- [4] 关于公布可用于婴幼儿食品的菌种名单的公告[EB/OL]. <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7891/201111/a10fe4a0b1dd477c9884649220368cc2.shtml>.2011-11-02. About release the announcement of “bacterial strain for infant food”[EB/OL]. <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7891/201111/a10fe4a0b1dd477c9884649220368cc2.shtml>.2011-11-02.
- [5] 庞会利, 谈重芳, 蔡义民, 等. 乳酸菌分类鉴定方法的研究进展[J]. 中国酿造, 2009, 6: 1-5. Pang HL, Tan CF, Cai YM, *et al.* Progress in research on lactic acid bacteria identification methods [J]. *Chin Brew*, 2009, 6: 1-5.
- [6] 刘洋, 张清平, 段文锋. 双歧杆菌分子分型鉴定研究进展[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(5): 43-47. Liu Y, Zhang QP, Duan WF. Research progress of molecular methods for classification and identification of the genus of *Bifidobacterium* [J]. *Chin Dairy Ind*, 2014, 42(5): 43-47.
- [7] 董银苹. 乳酸杆菌分离鉴定技术研究进展[J]. 卫生研究, 2008, 37(4): 508-510. Dong YP. Development of isolation and identification of *Lactobacillus* [J]. *J Hyg Res*, 2008, 37(4): 508-510.
- [8] 吴拥军, 王嘉福. 应用 16S rDNA 鉴定食品中的双歧杆菌[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 359-361. Wu YJ, Wang JF. 16S rDNA-based identification of *Bifidobacterium* in foods [J]. *Food Sci*, 2009, 30(18): 359-361.
- [9] GB 4789.34-2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌的鉴定[S]. GB 4789.34-2012 National Food Safety Standard Food microbiology test-Identification of of *Bifidobacterium* [S].
- [10] GB 4789.35-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验乳酸菌检验 [S]. GB 4789.35-2010 National Food Safety Standard Food microbiology test-Lactic acid bacteria inspection [S].
- [11] 杨滴, 王耀兵, 李冬梅, 等. 粪便中大肠埃希菌的分离鉴定[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(3): 1-5. Yang D, Wang YB, Li DM, *et al.* Isolation and identification of *E. coli* from feces [J]. *J Microbiol*, 2007, 27(3): 1-5.
- [12] Dellaglio F, Dicks LMT, Dutoit M. Designation of ATCC 334 in place of ATCC 393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei* (Collins *et al.*, 1989) [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41(2): 340-342.
- [13] 李玮, 张正. API 法与 16S rRNA 法鉴定棒状杆菌比较[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(11): 1361-1364. Li W, Zhang Z. Comparison between API and 16S rRNA to identify *Corynebacterium* [J]. *Chin J Lab Diagn*, 2008, 12(11): 1361-1364.
- [14] Summanen PH, Rowlinson MC, Wootton J. Evaluation of genotypic and phenotypic methods for differentiation of the members of the *Anginosusgroup streptococci* [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009, 28: 1123-1128.
- [15] 鲁辛辛, 王玫, 周宇. 细菌核酸分类鉴定技术的研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(6): 394-397. Lu XX, Wang M, Zhou Y. Advances of nucleic acid classification and identification on bacteria [J]. *Chin J Lab Med*, 2004, 27(6): 394-397.
- [16] Sakata S, Ryu CS, Kitahara M, *et al.* Characterization of the genus *Bifidobacterium* by automated ribotyping and 16S rRNA gene sequences [J]. *Microbiol Immunol*, 2006, 50(1): 1-10.
- [17] Bouchet V, Huot H, Goldstein R. Molecular genetic basis of ribotyping [J].

Clin Microbiol Rev, 2008, 21(2): 262–273.

- [18] Massi M, Vitali B, Federici F, *et al.* Identification method based on PCR combined with automated ribotyping for tracking probiotic *Lactobacillus* strains colonizing the human gut and vagina [J]. J Appl Microbiol, 2004, 96(4): 777–786.
- [19] Mattarelli P, Bonaparte C, Pot B, *et al.* Proposal to reclassify the three biotypes of *Bifidobacterium longum* as three subspecies: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* subsp. nov., *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* comb. nov. and *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* comb. Nov [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(4): 767–772.
- [20] Sakata S, Kitahara M, Sakamoto M, *et al.* Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum* [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52(6): 1945–1951.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



蒋波, 药师, 主要研究方向为微生物学检验。

E-mail: jb_cn@163.com



杨美成, 博士, 主任药师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析与微生物学检验。

E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com