



**HAL**  
open science

## Action sur la flore intestinale de laits fermentés au Bifidobacterium

J Ballongue, Jp Grill, P Baratte-Euloge

► **To cite this version:**

J Ballongue, Jp Grill, P Baratte-Euloge. Action sur la flore intestinale de laits fermentés au Bifidobacterium. *Le Lait*, 1993, 73 (2), pp.249-256. hal-00929333

**HAL Id: hal-00929333**

**<https://hal.science/hal-00929333>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## Probiotiques, bactéries probiotiques, levains

# Action sur la flore intestinale de laits fermentés au *Bifidobacterium*

J Ballongue, JP Grill, P Baratte-Euloge

Laboratoire de chimie biologique, Université de Nancy I,  
BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

**Résumé** — Depuis l'apparition des laits fermentés au «Bifidus», de nombreuses études tendant à montrer le rôle probiotique des bifidobactéries ont été entreprises. Nous avons étudié sur une population de 93 volontaires l'action de 3 laits fermentés du commerce sur certains genres bactériens hôtes habituels de l'intestin de l'homme. Après identification des espèces bifides utilisées, nous avons montré que seul un des laits fermentés contenant *Bifidobacterium longum* agit sur les populations étudiées. La sélection de souches de *Bifidobacterium longum*, résistantes au 5-fluorouracile nous a permis de montrer que toutes les souches d'une même espèce ne sont pas douées du même potentiel probiotique et que certaines souches industrielles sont capables de coloniser et de se multiplier dans le gros intestin de l'homme.

***Bifidobacterium* / flore intestinale / lait fermenté / marquage de souche**

**Summary** — Effects of *Bifidobacterium* fermented milks on human intestinal flora. The action of 3 commercial *Bifidobacterium* fermented milks was studied on intestinal flora. The effect of *Bifidobacterium* species differed according to whether it was of human or animal origin. The consumption of human origin *Bifidobacterium* fermented milk (HBFM) induced a 8 000-fold increase in intestinal *Bifidobacterium* flora. No growth was seen with the consumption of animal origin *Bifidobacterium* fermented milk (ABFM). Moreover, HBFM consumption decreased *Clostridium*, *Bacteroides* and *coliform* flora respectively by 250-, 16 000- and 400-fold. 5-Fluorouracil resistant-strains of *Bifidobacterium longum* BB 536 were shown to be able to colonize and to grow in the large intestine. Most of the observed increase of *Bifidobacterium* flora was due to this strain, which represented 80% of the total *Bifidobacterium* flora.

***Bifidobacterium* / intestinal flora / fermented milk / labelling of strains**

## INTRODUCTION

Depuis leur découverte en 1899 (Moro, 1990; Tissier, 1899; Tissier, 1900) la position taxonomique des bifidobactéries a connu de nombreux changements (Mitsuoka, 1984; Rasic et Kurmann, 1983). Leurs effets probiotiques évoqués au début du siècle (Tissier, 1900) ont reçu une première démonstration dans les années 50 (Manciaux, 1958). En raison de ces effets, les industriels japonais se sont lancés dans le développement des applications agroalimentaires des bifidobactéries (Ebisawa *et al*, 1897; Mitsuoka, 1982; Yamasaki *et al*, 1985). C'est en 1986 que fut lancé le premier lait fermenté au bifidus en France; il s'en suivit la publication d'un certain nombre d'articles évoquant les propriétés probiotiques de ces produits (Hamzé, 1984; Fernandes *et al*, 1987; Asselin, 1988; Romond, 1988; Botazzi, 1990). Plus récemment, il a été fait mention d'un effet anti-microbien chez l'animal (Faure *et al*, 1982; Yamasaki *et al*, 1982) et il a été démontré *in vitro* la production de bactériocine par certaines souches (Meghroun *et al*, 1990).

Dans le but de démontrer l'effet probiotique des *Bifidobacterium* chez l'homme, nous avons testé les 3 principaux laits fermentés commerciaux vendus en France et, dans un second temps, nous avons étudié l'action de laits fermentés contenant des souches identifiées de *Bifidobacterium longum*. Ces études ont porté sur 93 volontaires qui ont ingéré 3 fois par jour 125 g de lait fermenté. Nous avons suivi l'action de cette consommation sur les populations endogènes en anaérobie, *Clostridium*, *Bacteroides*, coliformes et naturellement *Bifidobacterium*. La mise au point d'une méthode de marquage nous a permis de faire la distinction entre les bifidobactéries ingérées et endogènes au niveau des fécès. Cette étude a reçu l'approbation du comité local d'éthique.

## MATERIELS ET METHODES

### Essais cliniques

Les tests cliniques que nous avons réalisés se sont déroulés sur 10 sem, période qui a été divisée en 4 étapes :

#### Première étape (2 sem)

Les volontaires (48 pour la première série et 45 pour la seconde) se sont abstenus de consommer des produits laitiers fermentés.

#### Deuxième étape (2 sem)

Les volontaires continuent à s'abstenir de consommer des produits fermentés et nous procédons à l'analyse des fécès tous les 2 jours.

#### Troisième étape (3 sem)

Les volontaires sont répartis selon les séries en différents groupes.

##### Première série

Quarante-huit volontaires répartis en 4 groupes de 12 :

- le premier groupe A sert de témoin et ne reçoit aucun lait fermenté;
- les autres groupes B,C,D reçoivent chaque jour 3 fois 125 g de lait fermenté (1, 2 ou 3) contenant au minimum  $10^7$  bifidobactéries par g de produit.

##### Deuxième série

Quarante-cinq volontaires répartis en 5 groupes de 9 :

- le groupe I reçoit un lait fermenté à *Bifidobacterium longum* souche BB536;
- le groupe II reçoit un lait fermenté à *Bifidobacterium longum* souche BB536 S 15 (voir paragraphe suivant);
- le groupe III reçoit un lait fermenté à *Bifidobacterium longum* souche ATCC 15707;
- le groupe IV reçoit un lait fermenté à *Bifidobacterium longum* souche ATCC 15707 S 42;

– le groupe V reçoit un yaourt fermenté avec les levains yaourt utilisés pour fabriquer les produits ci-dessus.

Pendant cette troisième étape la numération des genres bactériens sélectionnés est réalisée dans les mêmes conditions que dans l'étape précédente.

### Quatrième étape (3 sem)

Les volontaires cessent toute consommation de lait fermenté et les analyses des fécès sont réalisées dans les mêmes conditions que pendant la seconde étape.

#### Identification des espèces présentes dans les produits testés

Les souches que nous avons isolées dans les 3 laits fermentés au *Bifidobacterium* ont été identifiées par deux approches : la méthode phénotypique décrite par Mitsuoka (1969) et nous avons mis au point une méthode d'extraction de l'ADN dérivée de celle de Sambrook *et al* (1989) permettant l'identification génotypique des bifidobactéries (Kelly *et al*, 1970; Maniatis *et al*, 1982).

#### Isolement et utilisation de souches marquées

Nous avons opté pour une stratégie visant à sélectionner des souches résistantes à un substrat toxique pour l'ensemble de la flore intestinale, notre choix s'est porté sur le 5-fluorouracile (5-FU). Nous avons mesuré le seuil de toxicité de ce produit pour la flore et nous avons montré qu'à 1 g/l, aucune colonie ne pouvait être obtenue à partir de plusieurs échantillons de fécès. Nous avons alors recherché des mutants des souches BB536 et ATCC15707 sur des milieux contenant des concentrations croissantes de 5-FU.

Les souches mères ont été étalées sur un milieu contenant des concentrations de 5-FU comprises entre 0 et 1 g/l. Les colonies que nous avons obtenues ont été repiquées sur le même milieu contenant de 0,5 à 1 g/l de 5-FU,

et ainsi de suite jusqu'à atteindre des concentrations supérieures de 3 fois au minimum toxique.

Nous avons ainsi obtenu une souche de BB536 résistante à 5 g/l de 5-FU, que nous avons appelée BB536S15, et une souche de ATCC15707 résistante à 3 g/l de 5-FU, appelée ATCC15707S42.

### Analyse bactériologique des fécès

Un gramme de chaque échantillon de matière fécale est suspendu dans des conditions anaérobies ou non, selon le genre bactérien recherché, dans 10 ml de tampon tryptone/NaCl : L-cystéine (1 / 8,5 / 0,5 g/l). La suspension obtenue est diluée 10 fois en série dans le même milieu. 100 µl de chaque dilution sont étalés sur les milieux appropriés. Les cultures anaérobies sont réalisées dans une chambre anaérobie. Chaque numération est réalisée 3 fois. Les méthodes utilisées étaient les suivantes :

- flore anaérobie totale : les numérations ont lieu sur BL et EG Agar selon la méthode décrite par Mitsuoka *et al* (1967);
- *Bacteroides* : nous avons utilisé la méthode décrite par Mevissen-Verhage *et al* (1987);
- *Bifidobacterium* : nous avons utilisé la méthode classique décrite par Bennot *et al* (1984) de préférence à celle plus récente de Beerens (1990), qui est difficilement applicable aux bifidobactéries d'origine humaine. Pour les souches ATCC15707S42 et BB536S15, nous avons ajouté au milieu de base 3 g/l de 5 fluorouracile;
- *Clostridium* : leur population est suivie selon la méthodologie de De Vos *et al* (1982);
- Coliformes : ces bactéries sont dénombrées en suivant la méthodologie de Leclerc et Moriametz (1980).

## RÉSULTATS

### Identification des souches présentes dans les 3 laits fermentés étudiés

L'étude phénotypique nous a permis de classer les souches des laits fermentés 1,

2 et 3 dans les espèces *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium animalis*, sans pour autant avoir de certitude. Les résultats de l'étude génotypique présentés dans le tableau I nous permettent d'affirmer que la souche isolée du lait fermenté 3 appartient au genre *Bifidobacterium longum*, puisque les pourcentages d'homologie sont de 98 et 99%. Cette identification nous a été confirmée par la suite par le producteur du lait fermenté 3, la souche en question étant celle décrite par Mose et al (1979) et correspondant à l'appellation BB536. Pour les souches des laits fermentés 1 et 2, nous pouvons conclure qu'elles appartiennent à l'espèce *Bifidobacterium animalis*, avec des pourcentages respectifs d'homologie de 103 à 106% et 99 à 103% avec la souche de référence ATCC25527.

#### **Action de 3 laits fermentés au *Bifidobacterium* sur les flores étudiées**

L'examen des résultats obtenus sur 10 semaines d'expérimentation avec les laits fermentés 1 et 2 ne nous permet pas de conclure à un quelconque effet. Les valeurs données dans le tableau II montrent que la consommation du lait fermenté 1 induit une diminution d'un facteur 10 du nombre de coliformes en fin de 7<sup>e</sup> se-

maines et que le lait fermenté 2 agit de la même façon sur les *Clostridia*. En revanche, l'ingestion du lait fermenté 3 se traduit par un effet spectaculaire sur les flores étudiées après 3 semaines de consommation de ce produit. Nous observons, d'une part, que la flore anaérobie et surtout que les *Bifidobacteria* se sont considérablement multipliés, par un facteur 60 pour les premiers et par près de 8 000 pour les bifidobactéries et que, d'autre part, les populations suivies ont toutes régressé. Cette diminution va d'un facteur 250 pour les *Clostridium* à 400 pour les coliformes et ce qui est le plus important 16 000 pour le genre *Bacteroides*. Ces effets se font encore sentir de façon non négligeable, en semaine 10, soit 3 sem après l'arrêt de toute consommation de lait fermenté. La nature des souches présentes dans ces 3 laits fermentés est sans doute l'explication de ces comportements différents. Les laits fermentés 1 et 2 contiennent des souches d'origine animale : *Bifidobacterium animalis*, qui devraient être plus spécifiques de l'animal tandis que le lait fermenté 3 contient une souche à spécification humaine, *Bifidobacterium longum*.

Nous avons voulu savoir si toutes les souches d'une même espèce étaient douées des mêmes propriétés. Dans ce but, nous avons procédé, en collaboration avec le producteur du lait fermenté 3, à la

**Tableau I.** Identification génotypique des souches de bifidobactéries isolées des 3 laits fermentés commerciaux.

	Lait fermenté			B longum ATCC 15707	B animalis ATCC 25527
	1	2	3		
Lait fermenté 1	99	95	14	6	103
Lait fermenté 2	93	97	22	16	98
Lait fermenté 3	13	19	101	98	11
<i>B longum</i> ATCC 15707	4	12	99	102	6
<i>B animalis</i> ATCC 25527	106	103	12	7	101

**Tableau II.** Analyse de la flore fécale avant, pendant et après consommation de laits fermentés aux bifidobactéries.

Étape	Groupe	Sem	Anaer	Bifido	Clostr	Bact	Coli
2	ABCD (48)*	3 et 4	8,5	6,2	5,8	8,3	7,2
	A (12)*	7 10	8,4 8,5	6,3 6,2	6,1 6,1	8,1 8,1	7,5 7,2
3	B (12)*	7 10	8,3 8,2	7,1 6,4	6 5,7	8 8,1	6,2 7,6
	C (12)*	7 10	8,5 8,6	6,6 6,4	4,8 5,9	8 8,1	7,5 7,4
3	D (12)*	7 10	10,3 8,6	10,1 8,2	3,4 5,3	4,1 6,2	4,6 6,9

\* Nombre de sujets. Toutes les valeurs sont données en log. Groupe A : aucun lait fermenté; B : lait fermenté 1; C : lait fermenté 2; D : lait fermenté 3. Anaer : anaérobies; Bifido : *Bifidobacterium*; Clostr : *Clostridium*; Bact : *Bacteroides*; Coli : coliformes.

fabrication de 5 laits fermentés à l'aide de *Bifidobacterium longum*. Nous avons donc inclus dans les fabrications, outre la souche BB536, les souches ATCC15707, BB536S15 et ATCC15707S42, ces 2 dernières dans le but de suivre le comportement des souches exogènes dans le gros intestin.

Les résultats que nous avons obtenus sont reportés dans le tableau III. La première remarque que nous pouvons faire est que nous retrouvons les résultats obtenus précédemment en ce qui concerne la souche BB536. Nous pouvons aussi remarquer que les souches BB536S5 et ATCC15707S42 se comportent de la même façon que les souches dont elles sont issues. Trois autres constatations doivent être faites : la souche ATCC15707 n'a pas du tout le même effet que la souche

BB536, qui appartient pourtant à la même espèce; elle n'affecte que très peu les populations étudiées, bifidobactéries multipliées par 15 contre 5 000 et *Clostridium* divisés par 10 contre plus de 100 fois avec BB536. La seconde constatation que nous devons faire concerne la souche BB536S15. Les résultats que nous avons obtenus montrent 2 choses : c'est bien la souche ingérée qui est responsable de l'augmentation de la flore bifide totale, puisque cette souche représente 80% de cette population après 3 sem d'ingestion, et surtout, nous montrons ici que cette souche est capable de s'implanter et se multiplier dans le tube digestif puisque 3 sem après l'arrêt de sa consommation, on retrouve cette souche présente dans les fécès, et qu'elle représente encore 60% de la flore bifide totale.



**Tableau III.** Analyse de la flore fécale avant, pendant et après consommation de laits fermentés à *Bifidobacterium longum*.

Étape	Groupe	Sem	Anaer	Bifido	Clostr	Bact	Coli	BB 536 S15	ATCC 15707 S42
2	I,II,III,IV,V (45)*	3 et 4	8,4	6,2	5,7	8,2	7,1	nd	nd
		I (9)*	7 10	10,4 8,8	10,2 8,4	3,5 5,2	4 6,1	4,4 6,8	nd nd
	II (9)*	7 10	10 9,2	9,9 8,6	3,6 5,5	4,3 6	4,2 6,9	9,8 8,4	nd nd
		III (9)*	7 10	8,4 8,3	7,3 6,3	4,8 5,7	8,1 8,1	7,1 7,2	nd nd
	IV (9)*		7 10	8,2 8,4	7,4 6,2	4,9 5,7	7,9 8	7,3 7,1	nd nd
		V (9)*	7 10	8,2 8,5	6 5,9	5,8 5,5	8,4 7,9	7,1 7	nd nd

Nombre de sujets. Toutes les valeurs sont données en log. Groupe I : lait fermenté à BB 536; II : lait fermenté à BB 536 S15; III : lait fermenté à ATCC 15707; IV : lait fermenté à ATCC 15707 S42; V : yogurt. ND : non détecté; nd : non déterminé. Anaer : anaérobies; Bifido : *Bifidobacterium*; Clostr : *Clostridium*; Bact : *Bacteroides*; coli : Coliformes.

## CONCLUSION

Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude confirment ceux déjà publiés dans la littérature (Tissier, 1899, 1900; Reuter, 1964; Modler *et al*, 1990). Notre travail met en évidence qu'il existe une différence certaine entre les souches d'origine humaine et celles d'origine animale selon Reuter (1971) et la classification génétique de Scardovi *et al* (1971). Quel que soit le lait fermenté contenant des bifidobactéries d'origine animale, on assiste à une légère augmentation du nombre de bifides dans les selles, qui cesse dès l'arrêt de la consommation; en revanche, pour les laits fermentés contenant des espèces d'origine humaine, cette

augmentation est considérable et persiste durant 3 sem après l'arrêt de la consommation. Ce potentiel probiotique supérieur pour l'homme est confirmé par les résultats de l'action des flores bifides ingérées sur la flore intestinale, et plus particulièrement sur la flore putréfiante.

Nous démontrons aussi ici que toutes les souches d'une même espèce n'ont pas un effet équivalent sur les flores intestinales. Les résultats obtenus avec BB536 et ATCC15707 montrent qu'il existe un effet souche, et invalident l'hypothèse commune concernant le fait que ce sont les facteurs bifidigènes qui sont responsables de l'augmentation de la flore bifide (Romond et Romond, 1987). Cet effet souche est important, puisque nous montrons ici

que la souche BB536 de *Bifidobacterium longum* est capable de coloniser et de se multiplier dans le tube digestif.

Ce travail montre clairement que la fabrication de laits fermentés ayant une réelle vocation probiotique ne peut se faire avec des souches indéfinies comme c'est souvent le cas, et qu'un important travail d'identification et de sélection doit être réalisé. Les techniques d'identification classique par étude du phénotype se révélant inopérantes pour ce genre bactérien, l'utilisation de sondes génétiques (5) spécifiques soit du genre soit des espèces trouve sa totale application dans ce domaine. Dans le cas de tels laits fermentés, la sélection des souches devra tenir compte, à côté de l'aspect technologique, de l'évaluation non seulement *in vitro* mais surtout *in vivo* du potentiel probiotique des souches.

## RÉFÉRENCES

- Asselin D (1988) Effets de l'ingestion de laits fermentés au *Bifidobacterium longum* sur la flore intestinale humaine. Thèse Univ Caen, France
- Beerens H (1990) An elective and selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Lett Appl Microbiol* 11, 155-157
- Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T (1984) The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol* 28, 975-986
- Botazzi V (1990) Activité probiotique et thérapeutique des bactéries lactiques et des bifidobactéries. In: *Bifidobacterium et facteurs bifidogènes*. ARBA, ID2 Communication, Nancy, 9-31
- Colmin C, Pebay M, Simonet JM, Decaris B (1991) A species-specific DNA probe obtained from *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* detects strain restriction polymorphism. *FEMS Microbiol Lett* 81, 123-128
- De Vos N, Mevissen Verhage E, Harmsen-Van-Amerongen W, Marcelis JH (1982) A new selective medium for the culture of *Clostridium* from human feces. *Eur J Clin Microbiol* 1, 267-271
- Ebissawa E, Assari T, Takeda S, Watanabe A, Nihei K, Tamashita T, Wakiguchi H, Watanabe S (1987) Utilisation de lait fermenté additionné de bifidus actif chez la femme enceinte. 1<sup>er</sup> colloque «*Bifidobacterium longum* et Santé», Monte Carlo *Méd Chir Dig* 16, (3) 9-11
- Faure JC, Schellenberg D, Bexter A, Wurzner HP (1982) Barrier effect of *B longum* on *E coli* in germfree rat. *Int J Vitam Nutr Res* 52, 225-230
- Fernandes CF, Shahani KM, Amer MA (1987) Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol Rev* 46, 343-349
- Hamzé M (1984) Contribution à la production de facteurs bifidogènes et à leur étude *in vitro* et *in vivo*. Thèse Univ Lille, France
- Kelly RB, Cozzarelli NR, Deutscher MP (1970) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at a single strand break. *J Biol Chem* 245, 39-44
- Leclerc H, Moriamez JC (1980) Étude quantitative de la flore fécale de l'adulte et du nourrisson alimenté artificiellement. *Pathol Biol* 58, 217-226
- Manciaux M (1958) *Bifidobacterium bifidum* : ses facteurs de croissance. Essais d'implantation chez le nourrisson. Thèse Univ Nancy, France
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Meghrou S, Euloge P, Junelles AM, Ballongue J, Petitdemange H (1990) Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. *Biotechnol Lett* 12, 575-580
- Mevissen Verhage E, Marcelis J, De Vos N, Harmsen-Van-Amerongen W, Verhoef J (1987) *Bifidobacterium*, *Bacteroides* and *Clostridium* spp in fecal samples from breast-fed and bottle-fed infants with and without iron supplement. *J Clin Microbiol* 25, 285-289
- Mitsuoka T (1969) Vergleichende untersuchungen über die Bifidobacterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionsk Hyg Abt I Orig* 210, 52-64



- Mitsuoka T, Ohno K, Benno Y, Suzuki K, Namba K (1976) Die Faekalflora bei Menschen. IV. Mitteilung: Vergleich des neu entwickelten Verfahrens mit dem bisherigen üblichen Verfahren zur Darmfloraanalyse. *Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg I Abt Orig* A234, 219-233
- Mitsuoka T (1982) Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora* 1, 3-24
- Mitsuoka T (1984) Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora* 3, 11-28
- Modler HW, McKellar RC, Yagushi M (1990) Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can Inst Food Sci Technol J* 23, 29-41
- Momose H, Igarashi M, Era T, Fukuda Y, Yamada M, Katsuhiko O (1979) Toxicological studies on *Bifidobacterium longum* BB-536. *Oyoyakuri* 17, 881-887
- Moro E (1990) Über die nach Gram färbbaren Bacillen des Säulingsstuhles. *Wien Klin Wochenschr* 13, 114-5
- Râsic JL, Kurmann JA (1983) *Bifidobacteria and their role*. Birkhauser Verlag, Basel
- Reuter G (1964) Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora in Säulings und Erwachsenenstuhl. *Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt Orig* 191, 486-507
- Reuter G (1971) Designation of type strains for *Bifidobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* 21, 273-275
- Romond AF (1988) Apport d'un lait fermenté à *Bifidobacterium* dans le traitement des diarrhées à rotavirus du nourrisson. Thèse Univ Lille, France
- Romond MB, Romond C (1987) *Les Bifidobacterium*. Leur écologie et leur importance en santé humaine. 1<sup>er</sup> Colloque «*Bifidobacterium longum* et santé», Monte Carlo, *Méd Chir Digest* 16, (3) 3-6
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*. A laboratory manual, 2nd edn Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Scardovi V, Trovatielli LD, Zani F, Crociani F, Matteuzzi D (1971) Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* 21, 276-294
- Tissier MH (1899) La réaction chromophile d'Escherichel et le *Bacterium coli*. *CR Acad Sci* 51, 943-945
- Tissier MH (1900) Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Thèse Univ Paris, France
- Yamasaki S, Kamimura H, Momose H, Kawashima T, Ueda K (1982) Protective effect of *Bifidobacterium*-monoassociation against lethal activity of *Escherichia coli*. *Bifidobacteria Microflora* 1, 55-59
- Yamasaki S, Machii K, Tsuyuki S, Momose N, Kawashima T, Ueda K (1985) Immunological responses to monoassociated *Bifidobacterium longum* and their relation to prevention of bacterial invasion. *Immunology* 56, 43-50