

The Identification Conclusion of a Drink Case with Microbial Contamination

Limin Shi^{1,2}, Xiaoman Li^{1,2}, Yanhong Wang^{1,2}, Fukai Bao^{1,2*}, Aihua Liu^{2,3*}

¹Department of Pathogen Biology and Immunology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan

²The Institute for Tropical Medicine, Kunming Medical University, Kunming Yunnan

³Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan

Email: slm850912@126.com, *baofukai@126.com, *lunaliu123@yahoo.com.cn

Received: Dec. 10th, 2015; accepted: Dec. 28th, 2015; published: Dec. 31st, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To isolate and identify the unknown microbes from the contaminated drink. **Methods:** With the naked eye observation of colony characteristics of isolated microorganisms inoculated in artificial culture medium, observation of colony morphology selected for staining in Medan under the microscope. The total DNA was extracted by DNA extraction kit, and used as the template, the PCR method was used to amplify the ITS gene fragment of this gene fragment, purified, sequenced by sequencing company, then the sequencing results were compared with the BLASTn tool, to find out the sequence of related strains, finally, the sequence of strains and sequence related strains in phylogenetic analysis based on the MEGA5.1 software. **Result:** The bacterial colony characteristics observed by naked-eye and the morphological characteristics observed microscopically show that the unknown microbe belongs to fungi; BLASTn comparison results of ITS sequence show that the unknown microbe is *Aspergillus flavus*, the similarity of them is 94% - 95%, and the phylogenetic tree reconstructed based on ITS shows that it is in the same clade as *Aspergillus flavus*. **Conclusion:** The unknown microbe in the drink is *Aspergillus flavus*.

Keywords

Drink, *Aspergillus flavus*, ITS Genotyping, Food Contamination

一起饮料微生物污染的鉴定报告

史立敏^{1,2}, 李小曼^{1,2}, 王艳红^{1,2}, 宝福凯^{1,2*}, 柳爱华^{2,3*}

*通讯作者。

文章引用: 史立敏, 李小曼, 王艳红, 宝福凯, 柳爱华. 一起饮料微生物污染的鉴定报告[J]. 微生物前沿, 2015, 4(4): 69-77. <http://dx.doi.org/10.12677/amb.2015.44010>

¹昆明医科大学病原生物学与免疫学系, 云南 昆明

²昆明医科大学热带医学研究所, 云南 昆明

³昆明医科大学生物化学与分子生物学系, 云南 昆明

Email: slm850912@126.com, baofukai@126.com, lunaliu123@yahoo.com.cn

收稿日期: 2015年12月10日; 录用日期: 2015年12月28日; 发布日期: 2015年12月31日

摘要

目的: 从一起污染的饮料中分离未知微生物并对其进行种类鉴定。**方法:** 将分离出的微生物接种于人工培养基上培养, 肉眼观察其菌落特征; 挑取部分菌落用棉兰染色, 镜下观察其形态; 用DNA提取试剂盒提取其总DNA, 并以此为模板, PCR方法扩增其ITS区基因片段, 将该基因片段纯化后, 由测序公司对其进行序列测定; 将测序结果用BLASTn工具进行比对, 找出其序列的相关菌种; 最后用MEGA5.1软件对该测定序列菌种及其序列相关菌种进行进化分析。**结果:** 肉眼菌落特征、镜下形态观察结果显示该未知微生物属真菌; ITS区测序及BLASTn比对结果显示其为黄曲霉菌, 该未知菌与黄曲霉菌同源性高达94%~95%; 进化树构建结果显示其与黄曲霉菌在同一分支上。**结论:** 污染该饮料的未知微生物为黄曲霉菌。

关键词

饮料, 黄曲霉菌, ITS区基因鉴定, 食品污染

1. 引言

饮料是目前市场上非常畅销的产品, 为了满足人们需要, 各种各样口味的饮料随之出现。目前饮料一般是采用巴氏杀菌工艺, 有的同时采用紫外线灭菌, 但是, 有些饮料仍会有微生物污染; 因此, 寻找快速、准确鉴别污染饮料微生物的方法对于饮料生产厂家有效解决该问题具有重要的意义。传统的真菌分类学主要按照真菌的形态学、生理生化特点、抗原构造等特征; 由于真菌的种类众多、个体多态性明显, 因此传统的分类学指标常会得出假阳性或假阴性结果, 给真菌的分类鉴定带来了一定的难度; 近些年来, 利用真菌的基因型, 特别是核糖体 DNA(rDNA) (18S、28S 或 5.8S)基因及内转录区间隔序列(ITS, intervening internal transcribed spacer)的序列比对和分析的方法进行微生物分类鉴定已开始凸显出自身的优势; 该法简便易行, 事先无需对微生物特性有所了解, 快速而可靠, 特别是在表性特性鉴定失败时(如突变菌株的鉴定)有优势, 所以在医学、食品等微生物鉴定上也崭露头角, 正成为微生物分类鉴定的重要方法之一[1]-[3]。陈剑山等提出利用 PCR 扩增病原菌核糖体 ITS (Internal Transcribed Spacer)基因区段进行真菌鉴定、检测及病害诊断的方法因其快速、准确、简便而得到迅速地发展[4]。总结以上方法优缺点, 该实验将传统的微生物鉴定方法结合现代分子生物学研究技术对未知微生物的形态、基因等进行鉴定, 以确保准确鉴定出污染该饮料的微生物; 以下为我们对该未知微生物进行鉴定的一系列的方法及结论。某饮料厂的功能饮料在 2012 年 1 月到 6 月期间持续遭未知微生物污染, 采取多种防控措施无效, 故委托本实验室对该未知微生物污染事件进行鉴定, 以解决饮料污染问题; 同时也为饮料行业中饮料污染问题的解决提供了一系列的理论依据和方法。

2. 材料与方法

2.1. 样品

用已污染的瓶装饮料 B1-B5、未污染的饮料 G1-G5 接种到培养基中进行培养; 随机取 B2 和 B5 接种

的培养基中生长成熟的微生物，对其进行分子生物学技术的实验诊断。

2.2. 培养基

沙氏培养基、营养肉汤培养基、普通琼脂培养基。其中沙氏培养基主要用于真菌培养，普通琼脂培养基、营养肉汤培养基主要用于细菌培养。

2.3. 试剂

DNA 提取试剂盒为 BioFluX 公司的 Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit (cat.No:BSC14S1); 引物为通用引物 ITS1、ITS4，由宝生物公司合成；PCR 反应液为宝生物公司的 PerfectShot™ Taq，内含 loading dye mix, (code:D308A); DNA 纯化试剂盒为 TaKaRa DNA Fragment Purification (code:DV807A, lot:CA2001.); 溴化乙锭(北京鼎国)，BIOWST AGAROSE (上海 GENETECH)，1X TAE 电泳缓冲液，液氮，棉兰染色液。

2.4. 仪器设备

盖玻片，载玻片，接种环，研钵，酒精灯，1.5 ml、0.5 ml 离心管，1000、200、10 μ l 移液枪(GILSON)及枪头，高速离心机(美国 Sigama)，PCR 仪(杭州博日)，电热恒温水浴箱(上海医疗器械)，压力蒸气灭菌器(上海博迅)，电泳仪(BAYGENE BG-Power 600i)，T6 紫外可见分光光度计(北京普析通用)，生物安全柜(Thermo)。

2.5. 实验方法

2.5.1. 培养方法

取污染饮料和未污染的饮料分别接种到沙氏肉汤琼脂、营养肉汤琼脂、沙氏肉汤和营养肉汤培养基中，其中一组四种培养基放在阴暗、潮湿处 2 周后观察结果，另一组四种培养基放在 37℃ 温箱中，培养 24~48 小时后观察结果。

2.5.2. 棉兰染色法

用接种环从菌落的边缘挑取少量带有孢子的菌丝，置于载玻片中央，先用另一载玻片使劲挤压有菌部分，使得菌群铺成一薄层；然后在载玻片的中央有菌部分滴加乳酸石炭酸棉兰染色液，再轻轻盖上盖玻片，注意避免气泡产生。显微镜下镜检，先低倍镜后高倍镜。

2.5.3. 基因组 DNA 提取及 ITS 区 PCR 扩增与序列测定

引物：为通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [5] [6]，由宝生物公司合成。

DNA 模板制备：取培养基中对数期菌落放入研钵，将其用液氮进行研磨均匀后，按照试剂盒上步骤说明进行 DNA 的提取；琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 产物，用分光光度计对 DNA 进行定量。

PCR 体系和条件：PCR 反应液 25 μ L，ITS1 1 μ L (浓度为 20 μ M)，ITS4 1 μ L (浓度为 20 μ M)，DNA 模板 0.5 μ L，蒸馏水 22.5 μ L，总反应体系为 50 μ L。反应条件：94℃ 预变性 5 min；94℃ 1 min，55℃ 30 s，72℃ 1 min，循环扩增 36 次；72℃ 7 min 终延伸，4℃ 保存。用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测。PCR 产物的纯化：TaKaRa 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化，操作步骤按说明书进行；琼脂糖凝胶电泳检测纯化产物。

PCR 产物测序：由昆明滇工科技有限公司代理上海生工对纯化后的 PCR 目的片段进行测序。

2.5.4. 序列比对和系统发育树的构建

将 ITS 区序列在 GeneBank 核酸序列数据库(即在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> 进行 BLASTN 比对)中进行比对, 获取相关序列, 并与测定序列一起用 Clustal W(1.83)软件进行序列比对。以 MEGA5.1 的 p-distance 模型计算进化距离, 用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 并计算 bootstrap 值。

3. 结果

3.1. 培养结果

用未污染的饮料接种的培养基中, 均无微生物生长; 用污染的饮料接种的培养基中, 37℃温箱中, 各培养基均无微生物生长, 从而排除是细菌污染; 阴暗/潮湿环境中, 均有微生物生长, 其中比较典型的菌落如下。

3.1.1. 肉眼观察菌落

从左到右依次是沙氏、营养琼脂培养基未知菌生长情况。根据菌落及生长环境初步鉴定为真菌污染。

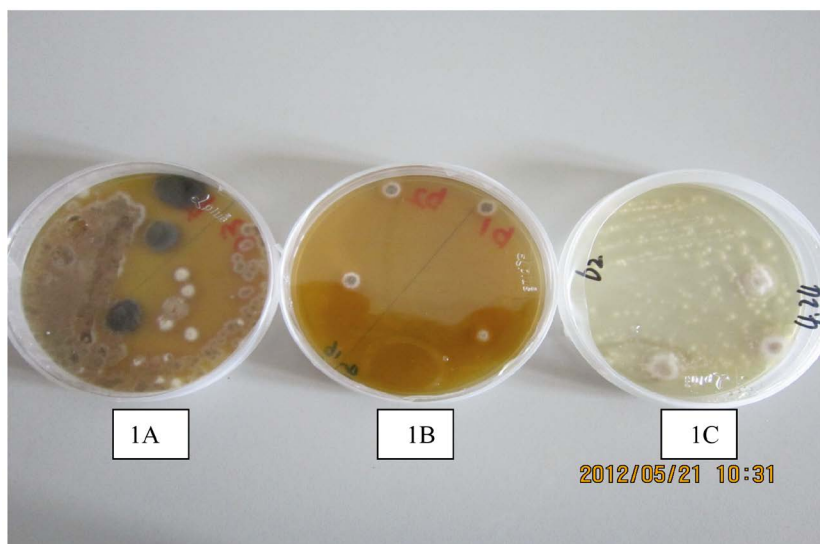
该菌菌落生长较快。菌落正面色泽也随其生长由白色变为黄色及黄绿色, 呈半绒毛状; 孢子成熟后颜色变为褐色; 表面平坦或有放射状沟纹, 反面无色或带褐色, 见图 1。

3.1.2. 镜下观察真菌

取少量真菌用棉兰染色法将其染色后, 镜下观察在低倍显微镜下观察可见分生孢子头呈疏松放射状, 继而为疏松柱状; 制片镜检观察, 可见分生孢子梗很粗糙, 顶囊呈烧瓶形或近球形; 分生孢子在小梗上呈链状着生, 分生孢子的周围有小突起、球形、粗糙; 见图 2; 进一步显示该未知微生物属于真菌, 但具体是真菌中哪一类, 还需进一步鉴定。

3.2. 总 DNA 提取

用 DNA 提取试剂盒, 严格按照其说明书步骤, 提取的该真菌的 DNA, 经分光光度计检测其浓度为 B2 为 19 ng/μL, B5 为 11 ng/μL, 琼脂糖凝胶电泳并经紫外光检测其分子量大小如图 3。



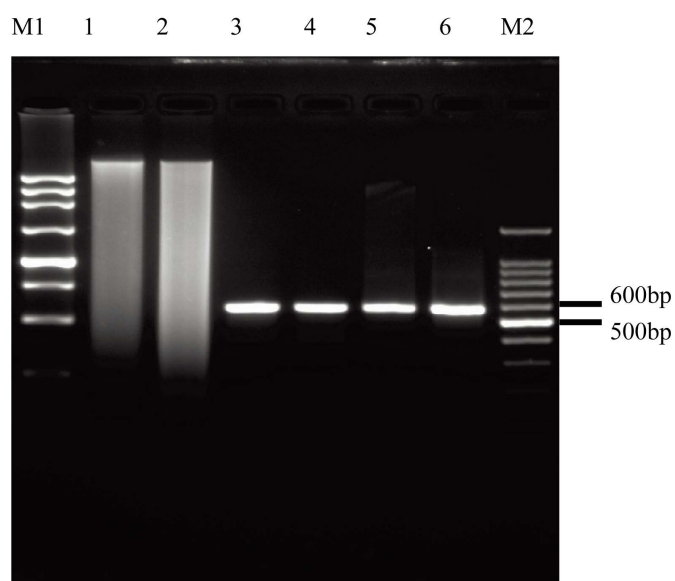
1A, 沙氏培养基; 1B, 营养肉汤培养基; 1C 普通琼脂培养基

Figure 1. Bacterial colony characteristics of the unknown microbe colonies

图 1. 未知菌菌落特点



Figure 2. Morphological characteristics of the unknown microbe
图 2. 未知菌的形态学特点



M1: 250 bp DNA Marker; 1: B2 DNA; 2: B5DNA; 3: B2 ITS PCR amplification; 4: B5 ITS PCR amplification; 5: B2 ITS purification; 6: B5 ITS purification; M2: 100 bp DNA Marker

Figure 3. AGE analysis of the unknown microbe's DNA, ITS PCR amplification, ITS purification

图 3. 未知菌 DNA、ITS 区 PCR 扩增产物、纯化后 ITS 区基因片断琼脂糖凝胶电泳分析

3.3. PCR 产物

用总 DNA 作为模板, ITS1、ITS2 为引物, 进行 PCR 反应, 扩增出目的条带(包括 ITS1、5.8S 和 ITS2 的全长 ITS 区域序列), 大小约 600 bp, 经琼脂糖凝胶电泳及紫外光检测结果如图 3。

3.4. PCR 纯化结果

用 PCR 纯化试剂盒对 PCR 扩增后产物进行纯化, 以备测序时用; 纯化结果经琼脂糖凝胶电泳及紫

外光检测，结果如图 3。

3.5. 测序结果

对纯化后的目的条带由测序公司进行测序，B2 菌序列结果如图 4；B5 菌序列结果如图 5。

3.6. 序列比对结果及进化树的构建结果

3.6.1. 采用 Blastn 工具进行的序列比对结果

B2 菌比对结果如表 1，B5 菌比对结果如表 2。比对结果显示，B2 与 B5 未知菌与黄曲霉菌同源性高达 94%~95%。

3.6.2. 进化树构建结果

将比对相关序列与测定序列进行进化分析，结果如图 6；结果显示，B2、B5 未知菌与黄曲霉菌同在一个分支上。根据同源性比较和系统发育分析，可以看出，污染该饮料的未知菌是黄曲霉菌。

```
TTTGGGCTTGCTACCTGATCCGAGGTACCTGGTAAATAGAAGGTTGGAGACGCCGGCTGGCGCCCGGCCGCCCTAATCGAGCGGGTGACAAAGCCCCAT
ACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCGGGGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAAGGGCAGCAATG
ACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAGT
TCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAATAGGTTTGCTATCAAGCTCAGACAACACTAAAGACAAGAGGTTCAA
TGTGTTCTCCGGCGGCTACCCCGGGGGGGCGCACCCGCGAAGCAACGTTGGTCAGGTATTACGGGTGGGAGGTTAGGCCTGCCCGGGGGCAGACCTGC
ACTCGGTAATGATCCTCCGAGC
```

Figure 4. Sequence of B2 microbe's ITS PCR amplification

图 4. B2 菌 ITS 区 PCR 扩增产物测序序列结果

```
CAGTAATGATGGGTTCCGTACCTGATCGAGGTACCTGGTAAATAGAAGGTTGGAGACGCCGGCTGGCGCCCGGCCGCCCTAATCGAGCGGGTGACAAAG
CCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCGGGGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAAGGGCA
GCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCG
CAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAATAGGTTTGCTATCAAGCTCAGACAACACTAAAGACAAGAGGTTCA
AATGTGGTCTCCGGCGGCTACCCCGGGGGGGCGCACCCGCGAAGCAACGTTGGTCAGGTATTACGGGTGGGAGGTTAGGCCTGCCCGGGGGCAGACCTGC
CACTCGGTAATGATCCTCCGAGA
```

Figure 5. Sequence of B5 microbe's ITS PCR amplification

图 5. B5 菌 ITS 区 PCR 扩增产物测序序列结果

Table 1. BLASTn comparison of B2 microbe

表 1. B2 菌 BLASTn 比对结果

Sequences producing significant alignments							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AAIH02002862.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 gcontig_1106287687353, whole genome shotgun sequence	394	394	47%	6e-107	95%	
AAIH02001955.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 gcontig_1106287688027, whole genome shotgun sequence	398	398	48%	5e-108	95%	
AAIH02002526.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 gcontig_1106287687663, whole genome shotgun sequence	366	366	44%	1e-98	95%	
AAIH02002456.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 gcontig_1106287688741, whole genome shotgun sequence	446	446	56%	2e-122	94%	
AAIH02002900.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 gcontig_1106287689053, whole genome shotgun sequence	446	446	56%	2e-122	94%	
AAIH02002979.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 gcontig_1106287691753, whole genome shotgun sequence	446	446	56%	2e-122	94%	

Table 2. BLASTn comparison of B5 microbe
表 2. B5 菌 BLASTn 比对结果

Sequences producing significant alignments							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AAIH02002862.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 gcontig_1106287687353, whole genome shotgun sequence	394	394	46%	6e-107	95%	
AAIH02001955.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 gcontig_1106287688027, whole genome shotgun sequence	398	398	47%	5e-108	95%	
AAIH02002526.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 gcontig_1106287687663, whole genome shotgun sequence	366	366	44%	1e-98	95%	
AAIH02002456.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 gcontig_1106287688741, whole genome shotgun sequence	446	446	55%	2e-122	94%	
AAIH02002900.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 gcontig_1106287689053, whole genome shotgun sequence	446	446	55%	2e-122	94%	
AAIH02002979.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 gcontig_1106287691753, whole genome shotgun sequence	446	446	55%	2e-122	94%	

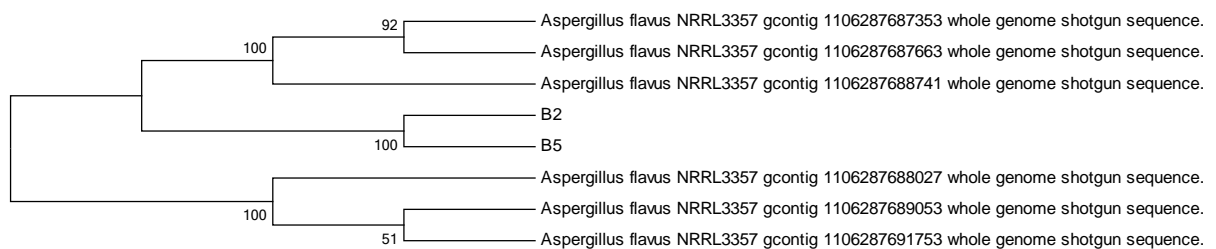


Figure 6. Phylogenetic tree base on ITS sequence of unknown microbe and *Aspergillus flavus*
图 6. 未知菌与相关黄曲霉菌 ITS 区序列的系统发育分析

4. 讨论

我们通过培养特性、形态学和分子系统学鉴定表明,此次饮料污染属于黄曲霉菌污染。分子系统学是鉴定食品饮料微生物污染的有效手段。林晓民等描述核糖体基因中内转录间隔区包含 2 个不同的非编码区域,即内转录间隔区 1 (ITS1)和内转录间隔区 2 (ITS2) [7]。ITS1 和 ITS2 常被合称为 ITS,并且 5.8 S RNA 基因也被包括在 ITS 之内。ITS 序列在物种属内、近缘属间乃至科内系统进化关系研究中有一定的价值。

郑雪松等总结真菌核糖体基因(rDNA)由小的亚单元(18 S)、ITS1 区、5.8 S 区、ITS2 区和大的亚单元(28 S)构成,rDNA 上的 5.8、18 和 28S rRNA 基因有极大的保守性,即存在着广泛的异种同源性[8]。而由于 ITS 区不加入成熟核糖体,所以 ITS 片段在进化过程中承受的自然选择压力非常小,因此能容忍更多的变异。在绝大多数的真核生物中表现出了极为广泛的序列多态性,即使是亲缘关系非常接近的 2 个种都能在 ITS 序列上表现出差异,显示最近的进化特征。ITS1 和 ITS2 是中度保守区域,其保守性基本上表现为种内相对一致,种间差异比较明显,这种特点使 ITS 适合于真菌物种的分子鉴定以及属内物种间或种内差异较明显的菌群间的系统发育关系分析;由于 ITS 的序列分析能实质性地反映出属间、种间以及菌株间的碱基对差异,此外 ITS 序列片段较小、易于分析,目前已被广泛应用于真菌属内不同种间或近似属间的系统发育研究中;根据这些基因上高度保守区段设计出通用引物,借助 PCR 技术扩增 rDNA

的目的片段进行序列分析。

郝天婷, 周帼萍在已知真菌污染果汁饮料的情况下, 利用 26S rDNA 基因序列分析鉴定出橙汁和葡萄汁中的污染菌为费希新萨托菌和出芽短梗霉菌[9], 由于其是果汁中常见耐热污染菌之一, 故没有对其进行进化树构建以对比其系统发育; 李辉等利用形态学方法和 ITS 区序列分析法分离并鉴定出 2 株霉菌, 进化树构建结果显示该 2 株霉菌分别为黄暗青霉和光孢青霉[10]; 该 2 例研究均是对特定饮料中已知真菌进行的分离及鉴定研究, 且该真菌为饮料中常见污染菌, 具有一定的参考价值。郭伟鹏等在果汁饮料中耐热霉菌的分离和鉴定研究中, 运用传统微生物检测方法对污染饮料中微生物进行了分离、纯化、鉴定及耐热霉菌检测, 结果鉴定出 3 种耐热霉菌, 该实验主要是对耐热霉菌的检测[11]。由此可见, 饮料中的微生物污染, 尤其是真菌, 极为常见; 寻找适用于各种微生物检测的系统、快速、准确的检测方法尤其必要。

黄曲霉是温暖地区常见的占优势的霉菌, 其生长温度范围在 4℃~50℃之间, 最适生长温度为 25℃~40℃。黄曲霉毒素形成的最低温度为 5℃~12℃, 最高为 45℃, 最适温度为 20℃~30℃ (28℃)。黄曲霉菌主要污染粮油食品、动植物食品等; 如花生、玉米, 大米、小麦、豆类、坚果类、肉类、乳及乳制品、水产品等均有黄曲霉毒素污染; 其中以花生和玉米污染最严重。黄曲霉菌产生的黄曲霉毒素具有很强的毒性, 特别是它的强致癌性, 世界各国对于其污染食品的情况都很重视; 因此, 如果饮料的原材料中涉及易被黄曲霉污染的材料时应引起人们的高度关注, 严格杜绝黄曲霉污染, 以防该毒素对人们的健康产生更大的危害。

5. 结论

我们利用真菌的通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增了污染该饮料真菌的部分 ITS 序列, 长度为 600 bp 左右, 包括 18S DNA 部分序列, ITS1-5.8S-ITS2 全序列和 28S DNA 部分序列; 利用这个片段开展的 BLASTN 比对, 发现其对应 NCBI 上大量曲霉属(*Aspergillus flavus*)真菌的相应序列, 长度约 400 bp 左右; 将这些相关序列与我们所测定的序列构建进化树发现, 它们同属曲霉菌属。结合前面的形态学观察结果, 我们推断, 实验中所测的真菌为黄曲霉菌。

参考文献 (References)

- [1] Lau, A., Chen, S., Sorrell, T., Carter, D., Malik, R., Martin, P. and Halliday, C. (2007) Development and Clinical Application of a Panfungal PCR Assay to Detect and Identify Fungal DNA in Tissue Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**, 380-385. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01862-06>
- [2] Lopandic, K., Zelger, S., Benschky, L.K., Eliskases-Lechner, F. and Prillinger, H. (2006) Identification of Yeasts Associated with Milk Products Using Traditional and Molecular Techniques. *Food Microbiology*, **23**, 341-350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2005.05.001>
- [3] Cappa, F. and Cocconcelli, P.S. (2001) Identification of Fungi from Dairy Products by Means of 18S rRNA Analysis. *International Journal of Food Microbiology*, **69**, 157-160. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00587-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00587-6)
- [4] 陈剑山, 郑服从. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 3785-3786, 3792.
- [5] 楼兵干, 张柄欣. 基于 rDNA ITS 序列探讨部分腐霉种的系统发育与其形态特征[J]. 菌物学报, 2005, 24(2): 207-220.
- [6] Paul, B. and Masih, I. (2000) ITS1 Region of the Nuclear Ribosomal DNA of the Mycoparasite *Pythium periplocum*, Its Taxonomy, and Its Comparison with Related Species. *FEMS Microbiology Letters*, **189**, 61-65. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09206.x>
- [7] 林晓民, 李振岐, 王少先. 真菌 rDNA 的特点及在外生菌根菌鉴定中的应用[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 120-125.
- [8] 郑雪松, 杨虹, 李道棠, 韩文卿. 基因间隔序列(ITS)在细菌分类鉴定和种群分析中的应用[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(6): 678-684.

- [9] 郝天婷, 周帼萍. 2 例果汁饮料中污染真菌的鉴定分析[J]. 中国酿造, 2010(9): 155-157.
- [10] 李辉, 刘光全, 程池. 2 株酸梅汤饮料污染霉菌的分离与鉴定研究[J]. 中国食品学报, 2009, 6(9): 182-187.
- [11] 郭伟鹏, 吴清平, 张菊梅, 邓梅清, 黄启红. 果汁饮料中耐热霉菌的分离和鉴定研究[J]. 生物技术通报, 2008: 244-247, 257.