

成品卷烟霉变微生物的分离纯化与鉴定

Isolation, purification and identification of microorganisms in moldy cigarettes products

雷 声¹ 杨乾栩¹ 师艳萍¹ 蒋举兴¹ 刘秀明¹

LEI Sheng¹ YANG Qian-xu¹ SHI Yan-ping¹ JIANG Ju-xing¹ LIU Xiu-ming¹

张 玲¹ 陈文怡² 汪雪娇² 曾熠程¹

ZHANG Ling¹ CHEN Wen-yi² WANG Xue-jiao² ZENG Yi-cheng¹

(1. 云南中烟工业有限责任公司技术中心, 云南 昆明 650231; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. Technology Center, China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming, Yunnan 650231, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:从霉变成品卷烟中分离、纯化得到5种菌株,并采用真菌形态学和显微镜检的方法进行鉴定。结果表明,引起卷烟霉变的微生物主要为曲霉菌、青霉菌、链格孢菌和枝孢菌;通过18S rDNA-ITS序列分析及构建系统进化树,鉴定为5个种,分别为聚多曲霉、黄曲霉、极细枝孢霉、指状青霉和链格孢属霉菌;通过致病性试验得出黄曲霉菌为导致卷烟霉变的主要菌株。

关键词:霉变卷烟;微生物;分离;鉴定;黄曲霉

Abstract: Five strains were isolated and purified from moldy cigarettes, and were identified by fungal morphology and microscopy. It was found that there were 2 strains of *Aspergillus*, 1 strain of *Penicillium*, 1 strain of *Alternaria*, and 1 strain of *Cladosporium*. Through the 18S rDNA-ITS sequence analysis and the construction of phylogenetic tree, the mildew microorganism of cigarettes were identified as five species, such as *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium tenuissimum*, *Penicillium digitatum* and *Alternaria*. It was concluded that *Aspergillus flavus* was the main strain causing mildew in cigarette products by the mildew experiment.

Keywords: mildew cigarette; microorganism; separation; identification; *Aspergillus flavus*

中国是世界第一烟叶生产国,产量约占世界总产量的1/3^[1]。伴随着中国卷烟消费结构的持续提升,消费者对优质卷烟产品的安全性和质量的要求也日益提高。由于调制后的烟叶中含有丰富的糖、有机酸、生物碱等营养物质,为霉菌的生长繁殖提供了条件。卷烟在流通及贮藏过程中,受环境温度、湿度的影响,发生霉变现象有一定几率,导致卷烟质量瑕疵甚至报废,造成巨大经济损失^[2]。

向东红^[2]从川渝不同地区的烟片中筛出了21种霉菌菌株,检出率较高的主要为黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和橘青霉(*Penicillium citrinum*)等;晏卫红等^[3]从广西的多处仓库烟叶中分离鉴定出9种曲霉,包括黑曲霉(*Aspergillus niger*)和聚多曲霉(*Aspergillus sydowii*)等;曾婷英等^[4]对烘烤期的霉变烟叶进行鉴定,发现导致霉变的主要为米根霉(*Rhizopus oryzae*)。大多数研究都是对卷烟生产前仓储期的霉变烟叶或烟片进行筛选和鉴定,而成品卷烟在后续的流通及贮藏过程中霉变微生物的分离和鉴定研究较少,成品卷烟流通及贮藏期间所处环境(包括温度、湿度等)与烟叶、烟片等在仓储期间所处环境不同,对卷烟微生物的影响不同^[5]。研究^[6-8]表明,卷烟霉变微生物主要有曲霉属、青霉属和枝孢霉属菌株。

试验拟采用3种不同的培养基涂布分离、划线培养纯化,再通过形态学和显微镜检个体形态、18S rDNA-ITS序列测定,分离、纯化和鉴定云南霉变卷烟中的微生物,并基于一种模拟卷烟环境的培养基,对筛分所得霉变微生物的致霉程度进行评价。旨在针对性地为销售期及后续贮藏期的防霉措施及防霉包装技术等提供科学依据,

基金项目: 云南中烟工业有限责任公司科技项目(编号:2017CP06);国家“十三五”重点研发计划(编号:2017YFD0400105)

作者简介: 雷声,云南中烟工业有限责任公司技术中心工程师,博士。

通信作者: 曾熠程(1981—),男,云南中烟工业有限责任公司技术中心工程师。E-mail: 42064367@qq.com

收稿日期: 2019-04-23

以减少卷烟经济损失,提高卷烟产品质量。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

霉变卷烟:以肉眼可见霉变为标准,筛选出流通环节的霉变成品卷烟,分3批采样,每批不少于100支,云南中烟工业有限责任公司技术中心;

烟叶:云南中烟工业有限责任公司技术中心;

氯霉素、琼脂、乳酸、氯化钠、苯酚、酒石酸钾钠、无水乙醇、甲基蓝:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基、氯硝胺 18%甘油琼脂(DG18)培养基、孟加拉红培养基:青岛海博生物技术有限公司;

烟汁培养基:5%烟叶浸出液 1 000 g,氯霉素 0.1 g,琼脂 18.0 g,115℃灭菌 20 min。

1.1.2 仪器与设备

电子天平:EL3002型,梅特勒—托利多有限公司;

生物安全柜:BSC-1500IIA2-X型,济南鑫贝西生物技术有限公司;

恒温恒湿培养箱:HWS-150型,上海森信实验仪器有限公司;

手提式压力蒸汽灭菌器:YXQ-LS-18SI型,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;

金相显微镜:BX51型,日本Olympus公司。

1.2 方法

1.2.1 卷烟霉变微生物的分离纯化 参照GB 4789.15—2016的方法,稍作修改。称取霉变成品卷烟10g,加入0.85%无菌生理盐水90 mL,(28±1)℃、180 r/min摇床震荡培养2~3 d,得到原始菌悬液,依次稀释10倍梯度。吸取1 mL菌悬液涂布于孟加拉红、PDA和DG18培养基中,恒温培养箱(28±1)℃、85% RH培养5 d。挑取少量菌落菌丝,划线于相应培养基中,(28±1)℃、85% RH条件下培养2 d,纯化3代,得到形态单一的菌落,于4℃冰箱保存备用。

1.2.2 卷烟霉变微生物的菌落特征分析 挑取1.2.1纯化后的少量菌丝,点植于PDA培养基平板的中间位置,(28±1)℃、85% RH条件下培养5 d。观察菌落的形态特征,根据《真菌鉴定手册》^[9]初步鉴定。

1.2.3 卷烟霉变微生物的个体形态特征分析 采用透明胶带镜检法^[10]。在载玻片上滴乳酸石炭酸棉兰染液,用食指与拇指使透明胶带呈U形,胶面朝下,轻轻触及1.2.1的单一菌落表面,浸入载玻片上的乳酸石炭酸棉兰染色液中,显微镜下观察,并根据GB 4789.16—2016进行鉴定。

1.2.4 18S rDNA-ITS序列分析 参照Li等^[11]方法,并稍作修改。取1.2.1得到的单一菌落平板进行18S rDNA-ITS序列测定。18S rDNA-ITS区域PCR反应使用引物ITS1和ITS4扩增ITS片段,30 μL反应体系含17.8 μL ddH₂O,3 μL Buffer,2 μL dNTP,3 μL Primer1,3 μL Primer2,1 μL模板DNA,0.2 μL Tag酶。PCR反应过程:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,循环35次,72℃延伸10 min,12℃保存。琼脂糖凝胶电泳条件:3 μL样品+1%琼脂糖凝胶,Marker条带100,250,500,750,1 000,2 000,3 000,5 000 bp。北京六合华大基因科技有限公司武汉分公司进行样品的序列测定,所得序列拼接校对对齐后,于NCBI数据库进行BLAST同源性比对,构建系统进化树,同源性>99%为种分界阈值,将待测菌株鉴定到种^[12]。

1.2.5 卷烟霉变微生物致霉性测定 取50.0 g烟叶,加入1 000 mL蒸馏水煮沸,2层纱布过滤两次后,加入18.0 g琼脂,定容至1 000 mL,121℃高压灭菌20 min,冷却至50℃左右,每200 mL培养基中加入20 mg氯霉素,摇晃均匀并冷却备用,得到烟汁培养基平板。挑取1.2.1纯化后的少量菌丝,点植于烟汁培养基中心,倒置于(28±1)℃、85% RH培养条件的恒温恒湿培养箱中培养5 d,以十字交叉法测量菌落直径,每组3个平行。以未点植处理的烟汁培养基平板作为阴性对照组。

1.3 数据处理

试验重复3次,通过Excel进行数据处理,以“平均值±标准偏差”表示。

2 结果与讨论

2.1 卷烟霉变微生物形态学分析

经多次划线分离、点植培养得到约20株形态不同的霉变菌株,对其培养形状(如隆起度、边缘、表面形状、光泽、颜色等)进行观察;通过显微镜检,观察霉变微生物的分生孢子、分生孢子梗、顶囊、有无横隔等个体形态情况,初步鉴定筛选得到形态各异的5个种,分别编号为A、B、C、D、E。霉变微生物菌落形态、个体形态特征及其描述如图1、2和表1所示。

由图1可知,5种菌的菌落均呈圆形,C菌落近似椭圆形,A、C菌落表面光滑,B、D、E表面均呈绒毛状;B、C、E菌落中心呈高凸起,其余为低凸起或无凸起;PDA培养基培养5 d后,B菌落直径最大,除中间菌落外,培养基边缘有孢子散落形成的较小菌落,生长较为茂盛。

由图2可见,5种菌株的菌丝均有隔膜,A、B、E菌株检出有分生孢子梗,分别为扫帚状、倒烧瓶状和卵状;C、D未检出分生孢子梗,且菌丝有大量分支。

2.2 卷烟霉变微生物的菌株鉴定

由图3可知,500 bp条带浓度为60 ng/3 μL,显示为

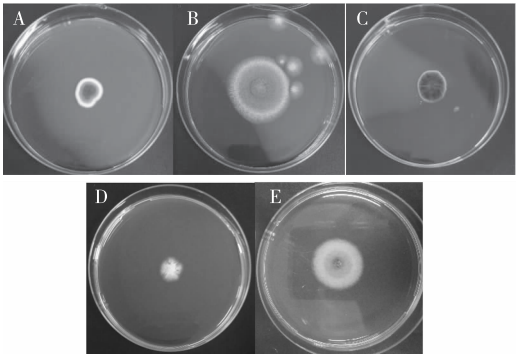


图 1 霉变微生物菌落形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of moldy microbial colonies

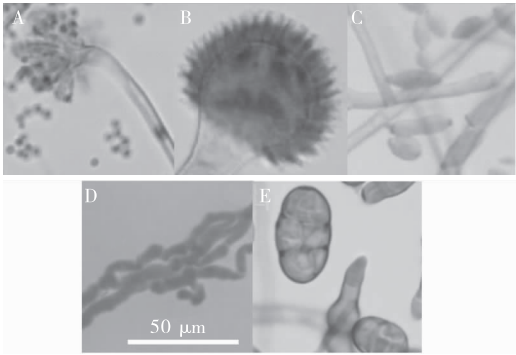


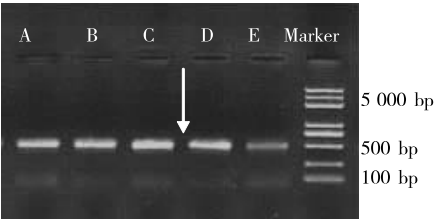
图 2 霉变微生物个体形态特征

Figure 2 Microscopic characteristics of moldy microorganisms

表 1 霉变微生物菌落形态和个体形态描述

Table 1 Morphological and microscopic description of moldy microbial colonies

编号	菌落形态描述	个体形态描述	初步鉴定结果
A	菌落呈圆形,表面光滑,低凸起,边缘完整,外浅里深,青色	菌丝细长有隔膜,分生孢子梗呈扫帚状,孢子彼此成串	曲霉属霉菌
B	菌落大而厚,呈圆形,绒毛状,高凸起,边缘完整,黄绿色	菌丝粗长有隔膜,有分生孢子梗,顶囊为倒烧瓶形	曲霉属霉菌
C	菌落椭圆形,表面光滑,高凸起,边缘有褶皱,青黑色	菌丝粗长有隔膜,分生孢子呈椭圆形,彼此连成串	枝孢属霉菌
D	菌落呈圆形,绒毛状,无凸起,表面光滑,边缘规则,乳白色	菌丝细长有隔膜,未检出分生孢子梗	青霉属霉菌
E	菌落呈圆形,绒毛状,高凸起,边缘完整,淡黄色	菌丝粗短有隔膜,分生孢子梗有分枝,分生孢子彼此成串,为卵形	链格孢属霉菌



电泳方向从上向下

图 3 琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 3 Results of agarose gel electrophoresis

加亮带,其余条带浓度均为 30 ng/3 μ L。

将提取得到的 DNA 于高通量测序平台上机检测,得到 18S rDNA-ITS 序列,根据 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,与 NCBI 数据库中的序列进行同源性分析,找出与待测菌株序列相似度最高且已知分类地位的真菌菌株,根据待测菌株的形态学结果、镜检观察结果和 ITS 序列分析鉴定待测菌株的种属。5 株卷烟霉变微生物鉴定结果为 4 个属,分别为曲霉属、青霉属、枝孢属和链格孢属,相似度均在 99% 以上,所得 5 株卷烟霉变微生物鉴定结

果如表 2 所示,分别为聚多曲霉、黄曲霉、极细枝孢霉、指状青霉及链格孢属菌(种名未知),形态学及显微镜检结果与 18S rDNA-ITS 序列测定结果相一致。

在卷烟霉变微生物分离和鉴定方面,李跃锋等^[6]筛选出卷烟致霉菌为球孢枝孢霉、黄曲霉、桔青霉和米曲霉;王儒等^[7]筛选得到枝孢属、桔青霉和黄曲霉等曲霉属菌株;谢欣等^[8]筛选得到枝孢霉属、黄曲霉属和桔青霉属。试验筛选得到多个菌属,与文献^[6-8]结果一致,曲霉属、青霉属和枝孢属菌株常见于霉变卷烟,而试验筛选所

表 2 卷烟霉变微生物的 18S rDNA-ITS 序列分析

Table 2 18S rDNA-ITS Sequence analysis of moldy microorganisms in cigarettes

编号	属	拉丁种名	中文种名	相似度/%
A	曲霉属	<i>Aspergillus sydowii</i>	聚多曲霉	99
B	曲霉属	<i>Aspergillus flavus</i>	黄曲霉	100
C	枝孢属	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	极细枝孢霉	100
D	青霉属	<i>Penicillium digitatum</i>	指状青霉	100
E	链格孢属	—	—	—

得链格孢属菌株未见报道,为首次发现。综上可知,黄曲霉多次筛分自霉变卷烟,表明其在霉变卷烟中分布较为广泛和突出;除黄曲霉外,试验筛选所得其他致霉菌种均与文献^[6-8]结果不同,可能与卷烟产地包装环境和流通过环节储存环境等因素有关。

将 5 株卷烟霉变微生物测试所得 18S rDNA-ITS 序列构建系统进化树。采用邻位相连法(Neighbor-Joining, NJ)进行进化距离分析^[13],运用 Bootstrap 对系统进化树进行检验,重复 1 000 次^[14]。由图 4 可知,5 株卷烟霉变微生物的 ITS 序列聚为 4 个分支,划分为曲霉属、青霉属、枝孢属、链格孢属,相同属的进化关系较近,以较高的支持率聚在同一分支。

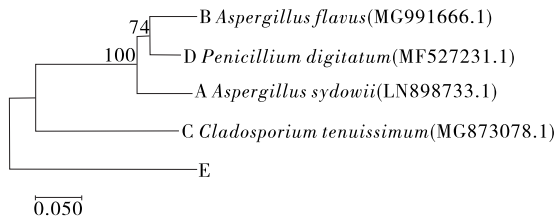


图 4 卷烟霉变微生物的 18S rDNA-ITS 系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of the strains isolated from moldy cigarettes based on the 18S rDNA-ITS sequence

2.3 卷烟霉变微生物致霉性测试

由表 3 可知,在 5 种卷烟霉变微生物中,B 黄曲霉致霉性最强,菌落直径达 (56.92 ± 1.09) mm,为卷烟霉变微生物主要菌株,致霉能力突出,与李春艳等^[15]从河南仓储烟叶中分离、纯化得到的优势霉变菌株相同;致霉性最弱的为极细枝孢霉,仅为 (12.47 ± 0.76) mm。

表 3 卷烟霉变微生物致霉性测试

Table 3 Evaluation of moldy degree caused by moldy microorganisms

编号	中文种名	致霉性/mm
A	聚多曲霉	17.56 ± 0.80
B	黄曲霉	56.92 ± 1.09
C	极细枝孢霉	12.47 ± 0.76
D	指状青霉	19.08 ± 1.00
E	—	39.00 ± 0.82

3 结论

研究采用 PDA、DG18 和孟加拉红培养基,从霉变卷烟中分离纯化出 20 株霉变微生物,再通过形态学和显微镜检,初步鉴定为 5 种形态各异的霉变微生物,分别为 2 种曲霉属菌,1 种青霉属菌,1 种链格孢属菌和 1 种枝孢属菌。通过 18S rDNA-ITS 序列分析及构建系统进化树,

鉴定为 5 个种,分别为聚多曲霉、黄曲霉、极细枝孢霉、指状青霉和一株链格孢属霉菌,与文献^[6-8]筛分所得菌属基本一致,菌种有所不同,其中链格孢属霉菌未见相关报道。通过致霉性试验进一步明确黄曲霉菌 $[(56.92 \pm 1.09)$ mm]为卷烟霉变的主要菌株,同时也是卷烟霉变报道中多次出现的常见菌株和烟叶霉变优势菌株,具有导致烟叶及烟草制品霉变的广泛性和突出性。霉变卷烟的微生物分布、致霉特征和优势菌株鉴定可为卷烟霉变防治、防霉剂研发等提供依据。

参考文献

[1] 梁栋. 烟草行业实时精准营销的实践策略分析与阐述[J]. 中小企业管理与科技, 2018(34): 9-10.

[2] 向东红. 川渝地区仓储片烟主要霉变微生物及防霉技术研究[D]. 青岛: 中国农业科学院, 2010: 28.

[3] 晏卫红, 黄思良, 朱桂宁, 等. 广西仓储烟叶霉变微生物的分类鉴定[J]. 烟草科技, 2008(2): 50-56.

[4] 曾婷英, 顾钢, 张绍升. 烘烤期烟叶霉烂病的病原鉴定[J]. 中国烟草学报, 2014(4): 65-68.

[5] 邱小梅. 环境温湿度对烟草物料水份的影响[J]. 福建质量管理, 2012(5): 61.

[6] 李跃锋, 王锐亮, 陈河祥, 等. 烟支霉变微生物的鉴定及其生物学特性分析[J]. 烟草科技, 2017, 50(6): 9-15.

[7] 王儒. 烟支霉变微生物的鉴定及生物特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015: 42.

[8] 谢欣. 烟支霉变微生物的分离与霉变成因研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014: 34-35.

[9] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 1-781.

[10] 冯长海. 改良透明胶带法在丝状真菌形态观察中的应用[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(10): 32-33.

[11] LI Zai-xin, LEI Yun-ling, LIU Da-yu, et al. Molecular cloning and sequence analysis of partial 18S rDNA of mold in Koji[J]. Food Science, 2009, 30(1): 211-213.

[12] 杨红红, 陈国刚, 刘娅, 等. 桶装胀罐番茄酱中腐败菌分离纯化及鉴定研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(1): 164-167.

[13] KOICHIRO T, MASATOSHI N, SUDHIR K. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(30): 11 030-11 035.

[14] 张耀东. 几种石莼目大型海洋绿藻的系统发育分析[D]. 苏州: 苏州大学, 2008: 17.

[15] 李春艳, 赵高岭, 叶红朝, 等. 河南烟叶仓储期优势霉菌的分离鉴定及防霉剂的筛选[J]. 烟草科技, 2011(7): 66-70.