

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.02.017

# 新采收稻谷与仓储稻谷的霉菌菌相分析

章采东<sup>1</sup>, 邱彦超<sup>1</sup>, 李殿威<sup>1</sup>, 符丽雪<sup>1</sup>, 钱丽丽<sup>1,2</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学 食品学院, 黑龙江 大庆 163319;

2. 黑龙江省农产品加工与质量安全重点实验室, 黑龙江 大庆 163319)

**摘要:** 采用传统培养法和宏基因组学技术对比了 2017 年新收获稻谷和将其仓储一年后稻谷中的真菌菌相差异。结果显示, 稻谷中的真菌菌群由各类田间真菌转变为曲霉类和青霉类等仓储型真菌为主的优势菌群, 并且两种方法的检测结果有着高度的一致性。可为稻谷在长距离运输期间的霉变防控提供重要的指导依据。

**关键词:** 稻谷; 传统培养法; 宏基因组; 优势菌群; 霉菌

中图分类号: TS205.9; S379.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2020)02-0103-05

## Fungal flora analysis of newly harvested rice and storage rice

ZHANG Cai-dong<sup>1</sup>, QIU Yan-chao<sup>1</sup>, LI Dian-wei<sup>1</sup>, FU Li-xue<sup>1</sup>, QIAN Li-li<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China;

2. Key Laboratory of Agro-Products Processing and Quality Safety of Heilongjiang Province, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

**Abstract:** This study compared the fungal flora of newly harvested rice in 2017 and that stored for 1 year by traditional culture method and metagenomics techniques. Results showed that the fungi flora in rice changed from various field fungi flora to the storage fungi dominant floras such as *Aspergillus* and *Penicillium*. The results of the two used methods are highly consistent. Exploring the composition and transformations of fungal flora of newly harvested rice and that stored for 1 year can provide important guidance for the prevention of mildew during long-distance transportation.

**Key words:** rice; traditional culture method; metagenomics; dominant fungal flora; fungus

2018 年, 我国稻谷总产量为 2.12 亿 t, 其中东北地区占据了很大份额。黑龙江地区一直以来都是我国最主要的粳稻种植区域, 其粳稻产量高达数千万吨, 大米供给量也达到了上千万吨<sup>[1]</sup>。

在长期的仓储过程中, 稻谷难免会产生发霉的现象, 霉变不仅导致稻谷的腐败和品质劣变, 更严重的是霉菌产生的剧毒真菌毒素严重危害消

费者的身心健康。关于稻谷中的霉菌总数限值, 国标中尚未作出明确的规定。有研究表明, 在一定条件下, 霉菌量在  $10^4$  cfu/g 以下, 稻谷能够安全储藏, 达到  $10^5$  cfu/g 时, 霉变开始发生, 超过  $10^6$  cfu/g, 稻谷已发生严重霉变<sup>[2]</sup>。谷物的霉变程度常常与带菌量相关, 但是并不能从带菌量判断真菌毒素水平超标, 这与霉菌的种类和环境因素有关<sup>[3-5]</sup>。

在不同的储粮生态区, 稻谷中的霉菌菌相具有显著的差异性, 主要与各储粮生态区的气候环境有关。吴红萍采集了海南各市县农户的储粮, 发现海南的霉菌主要为单端孢霉属、镰刀霉属、木霉属、头孢霉属、交链孢霉属和曲霉属; 而且东部、中部和西部市县的储粮带菌量呈现逐渐降

收稿日期: 2020-02-10

基金项目: “北粮南运” 散粮集装箱保质运输技术与装备研发 (2018YFD0401403-04); 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (LH2019C075)

作者简介: 章采东, 1994 年出生, 男, 硕士, 研究方向为农产品质量安全。

通讯作者: 钱丽丽, 1979 年出生, 女, 副教授, 博士, 研究方向为农产品产地溯源。

低的关系,菌量与含水量呈正相关关系<sup>[6]</sup>。奚萌发现江苏泰州的中储粮直属库中以曲霉菌为主,霉菌的种类在粮仓中呈现纵向的变化,最上层黄曲霉菌占比最高,自上而下逐渐降低,中层稻谷中灰绿曲霉菌占比最大,白曲霉菌占比最小。下层稻谷以白曲霉菌占比最大,黄曲霉菌占比最小<sup>[7]</sup>。和肖营分析了吉林省梅河口市储藏 4 个月的稻谷粮仓中的南墙、北墙附近稻谷中霉菌区系的演替情况,传统培养法分析结果表明,南墙和北墙的稻谷中的菌系以曲霉为主且无明显区别<sup>[8]</sup>。方宝庆在不同季节对储粮进行了详尽的研究,发现来自粮堆外部的的气温变化是引起储粮中的菌量呈现空间性动态变化最主要的因素<sup>[9]</sup>。Sinha 提出将粮仓作为一个类生态系统的概念,在粮仓的不同区间有着各自的微生态环境。他还指出谷物类型和品质、真菌种群和群落结构、霉菌毒素的产生和害虫的侵染等因素都是相互关联的,而温度、水分活度和气体组成是导致真菌感染和真菌毒素产生的关键环境因素<sup>[10]</sup>。

研究混合菌种的体系,最直接的方法是将各种菌类分离后再进一步研究。传统的微生物平板培养是分离样品中菌种经典的方法,但对于霉菌这种形态多样且多变的菌属,从形态判断种属经常出现较大的分歧,往往需要借助一定的分子生物学手段。但获得纯培养物再进行测序的方法往往会导致样品中微生物多样性丢失,在一定程度上影响结果的准确性。随着现代分子生物学的发展,基于宏基因组学的方法越来越多被应用到混合菌群分析体系中。真菌的内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)往往会表现极为广泛的序列多态性,且序列在 1 000 pb 到小于 300 pb 大小不等,长度适中,可以从中获得足够的信息用于属内种间或种内群体的系统学区分研究<sup>[11-12]</sup>。

实验采用传统分离法和宏基因组学法相结合的方法研究了新采收稻谷和仓储一年的稻谷中的菌相构成,为稻谷在长距离运输期间的霉变防控提供重要的数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 仪器

霉菌培养箱:上海森信实验仪器有限公司;

灭菌锅:上海申安医疗器械厂;PCR Purification Kit: Promega 公司;PCR 仪: Biometra 公司; Gel-Doc2000 凝胶成像分析仪: Bio-Rad 公司。

#### 1.1.2 材料与试剂

Ex Taq DNA Polymerase 等扩增试剂: TaKaRa 公司; ITS1/ITS4 引物: 上海生工公司; 孟加拉红培养基: 海博生物技术有限公司; PBS 缓冲液: 北京 Labgic 有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 样品的采集及预处理

粳稻:来自牡丹江某粮库 2017 年新收购稻谷,置于微生物采样袋中,于 4℃条件下运至实验室,隔年再次在此粮库进行随机取样用于本实验。

### 1.2.2 传统培养法分离纯化与鉴定

1.2.2.1 菌落的纯化 参照 GB 4789.15—2016 的方法培养稻谷中的霉菌。将不同形态的霉菌菌株进行纯化培养 3 代,纯化菌株送往北京博友顺生物技术有限公司进行鉴定。

1.2.2.2 DNA 提取与分析 取 25 μL 菌液,加入 25 μL 的真菌裂解液,在 85℃下裂解 15 min。提取的基因组 DNA 在浓度为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳中检测(105 V, 45 min),然后用溴化乙锭(EB)染色。

1.2.2.3 ITS 基因片段的 PCR 扩增与测序 选择真核生物 ITS 通用扩增引物扩增 ITS 区域,引物名称: ITS1/ITS4(ITS1: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA; ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC),扩增程序: 94℃变性 3 min; 94℃变性 1 min, 50℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 30 个循环; 72℃延伸 5 min。

1.2.2.4 PCR 扩增体系 DNA (70 ng/μL), 模板 2 μL; dNTP Mixture (2.5 mM) 2.5 μL; ITS1 (20 μM) 1.5 μL; ITS4 (20 μM) 1.5 μL; 10 × Ex Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 5 μL; Ex Taq 酶 (5 U/μL) 0.2 μL; 补足 ddH<sub>2</sub>O 到 50 μL。PCR 扩增产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,溴化乙锭(EB)染色后保存于 4℃备用。

1.2.2.5 目的 DNA 序列测序 PCR 扩增产物采用 Promega 纯化试剂盒纯化后用于测序。获得序列后在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析,最终确定菌株的种属类别。

### 1.2.3 稻谷表面微生物多样性检测

取 10 g 稻谷, 加入 50 mL PBS 缓冲液, 150~200 r/min 振荡 30 min; 超声 5 min, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤菌液, 重复 3 次。委托百迈客生物科技有限公司进行微生物多样性检测, 检测所用引物为 ITS1/ITS4 序列。

## 2 结果与分析

### 2.1 稻谷中纯化菌落的形态学鉴定

形态学鉴定主要是观察菌落的形态、颜色、质地、生长状态及生长速率等。如图 1 所示, 从新收获的稻谷中分离出 5 株真菌。单菌落在 27  $^{\circ}\text{C}$  培养 7~10 d, 观察各株菌的生长状态。A1 生长迅

速, 在 3 d 时间内即可覆盖整个平皿, 菌落整体为蓬松白色绒状气生菌丝, 生长后中间塌陷, 中间菌丝转变为淡黄色, 外部菌丝没有变化。A2 生长迅速, 在 5 d 时间内即可铺满整个平皿, 菌落底部为白色密实菌丝, 顶部为金黄色球体, 整体呈现为圈状金黄色与白色交替出现。A3 生长缓慢, 7 d 长至直径 3~5 cm, 菌落平坦, 中间微微隆起, 有棕黄色菌丝簇, 边缘为白色菌丝, 中层为棕黑色, 表面呈现为粉末状。A4 生长缓慢, 7 d 长至直径 1~2 cm, 菌落整体为棕褐色, 径向有沟壑, 表面呈现为粉末状。A5 生长缓慢, 7 d 长至直径 2~3 cm, 菌落整体为白色, 隆起, 中间下陷呈现淡黄色, 菌丝质地紧实。

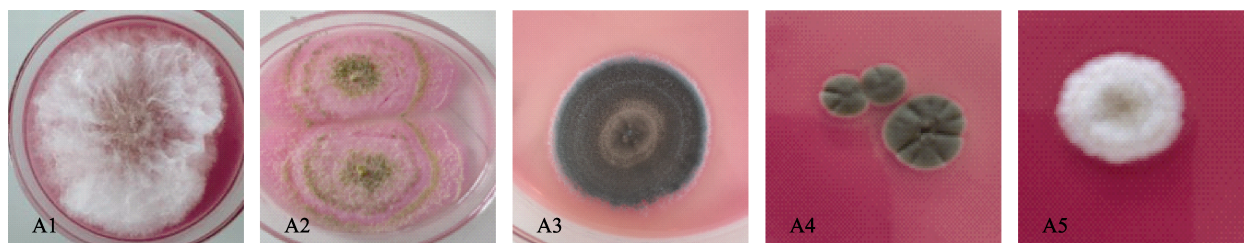


图 1 新收获稻谷中的真菌形态

从储藏 1 年的稻谷中分离出 5 株真菌, 如图 2 所示, 单菌落在 27  $^{\circ}\text{C}$  培养 7~10 d, 观察各株菌的生长状态。B1 生长缓慢, 7 d 长至直径 3~4 cm, 菌落为白色, 表面平坦、紧实, 分布淡黄色颗粒。B2 生长缓慢, 7 d 长至直径 1~2 cm, 菌落中间隆起, 有黄色菌丝簇, 边缘为白色气生菌丝, 径向有沟壑, 表面呈现为粉末状。B3 生长缓慢, 7 d

长至直径 2~3 cm, 菌落中间下陷为灰白色, 边缘为白色气生菌丝, 径向有沟壑, 表面呈现为粉末状。B4 生长缓慢, 7 d 长至直径 2~3 cm, 菌落中间下陷, 有青色菌丝簇, 边缘为白色气生菌丝, 径向有大量沟壑, 表面呈现为粉末状。B5 与 A3 呈现相同的形态特征, 从形态学可以判断为同一种霉菌。

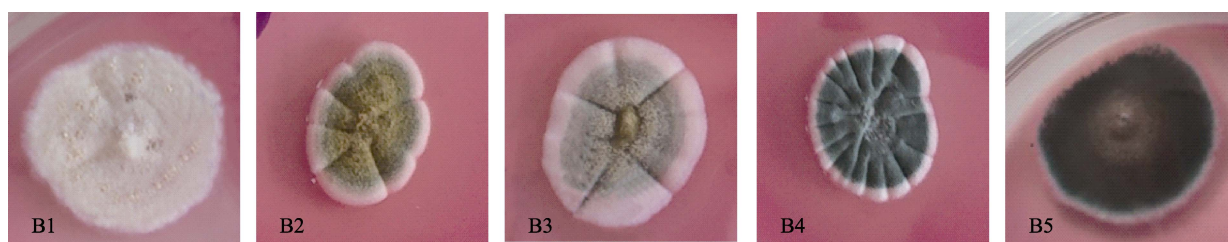


图 2 储藏一年的稻谷中的真菌形态

### 2.2 稻谷样品表面微生物的生物学鉴定

现代分子学技术可以准确鉴定到真菌的种属。图 3 为稻谷真菌 ITS 基因电泳图, 图 3A 所示, 新收获的稻谷中的菌株经 PCR 扩增获得的 ITS 序列在 550~650 bp, 在 NCBI 中进行 BLAST 比对, 菌株 A1 与 *Nigrospora oryzae* (KX985959)

同源性最高, 相似度达到 100%, A2、A3、A4 和 A5 与 *Trichoderma longibrachiatum* (KY495196)、*Aspergillus sydowii* (MG991624)、*Epicoccum nigrum* (KM507768) 和 *Cladosporium anthropophilum* (MF472933) 同源性最高, 相似度均为 99%。图 3B 所示, 储存 1 年的稻谷中的菌株经 PCR 扩增

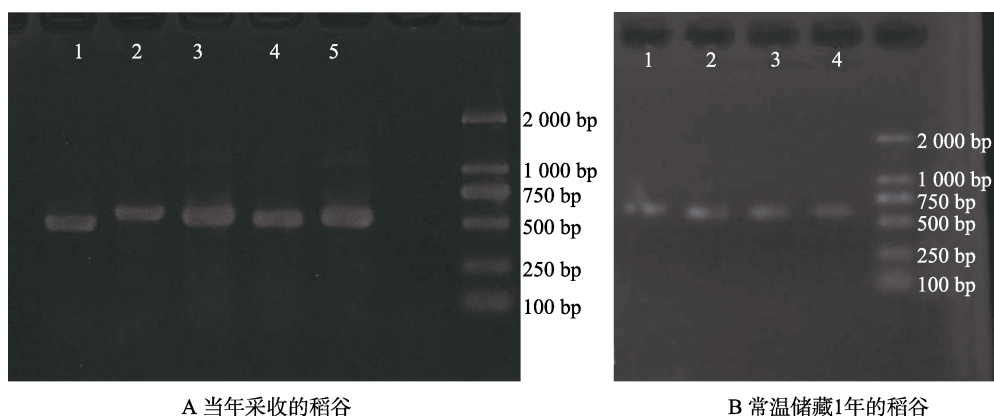


图 3 稻谷真菌 ITS 基因电泳图

获得的 ITS 序列长度在 550~600 bp。在 NCBI 中进行 BLAST 比对, 菌株 B1、B2、B3 和 B4 与 *Aspergillus candidus* (MH865265)、*Aspergillus jensenii* (MH725588)、*Aspergillus versicolor* (KJ527011) 和 *Penicillium brocae* (MH475444) 同源性最高, 相似度均为 100%。依据真菌的分子分类鉴定原则, 通过对 ITS 区域核苷酸序列进行比对, 序列相似性大于 99% 的菌株为同种; 序列相似性小于 99% 大于 95% 的为相同属; 序列相似性小于 95% 的鉴定为相同科<sup>[13]</sup>。*Nigrospora oryzae* (稻黑孢霉) 在我国分布广泛, 可侵染多种农作物。它对碱性条件敏感, 在 20~35 °C 环境下均可生长, 最适生长温度为 30 °C, 在高于 35 °C 的温度时菌丝生长受到显著抑制<sup>[14]</sup>。*Trichoderma longibrachiatum* (长柄木霉) 对多种田间真菌有明显的拮抗作用, 其发酵滤液可以有效抑制病原菌的菌丝生长, 是一种有益的田间真菌<sup>[15]</sup>。*Aspergillus sydowii* (聚多曲霉) 是一种耐高渗透压的霉菌, 有着很强的发酵能力<sup>[16]</sup>。有研究者发现其发酵液对田间害虫有一定的毒杀作用<sup>[17]</sup>, 也有研究者报道聚多曲霉会引起皮肤感染和支气管曲霉病<sup>[18-19]</sup>。*Epicoccum nigrum* (黑附球菌) 黑附球菌产生的酶类物质会通过降低其他菌类细胞膜的通透性或降解细胞壁中的成分来抑制其他菌类生长, 因此黑附球菌分生孢子是用于植物病害生物防治的首选接种体, 目前主要采用固体发酵生产<sup>[20]</sup>。田间真菌对稻谷生长同时存在着积极和消极的作用, 从收获到入库是田间真菌影响稻谷可食用性的关键过程, 控制入库时稻谷水分状态可以有效抑制此类真菌的生长。*Aspergillus candidus* (亮白曲霉) 是储粮中常见的曲霉类真菌,

在我国各地均有所发现。詹耀等人的研究证明了高压处理可以显著降低稻谷中亮白曲霉的存活率, 且保压时间越长存活量下降幅度越明显<sup>[21]</sup>。*Aspergillus versicolor* (杂色曲霉) 广泛分布于空气、土壤、腐败的植物体、贮藏的粮食和多种工、农业产品上, 是一种耐高渗透压的菌株, 在 25~35 °C 均可生长, 最适生长温度为 28 °C<sup>[22]</sup>。当粮仓粮温和环境湿度异常时仓储型真菌可能会大量生长, 影响稻谷的可食用性的, 甚至产生真菌毒素。

获得纯培养物再测序往往导致样品中微生物多样性丢失, 宏基因组能够更全面的反映微生物物种的组成状态。物种多样性分析和传统培养法的结果存在着统一而互补的关系。结果显示 (图 4), 在当年采收的稻谷中, 田间真菌占主导地位, 而仓储一年后曲霉类和青霉类等仓储型真菌成为

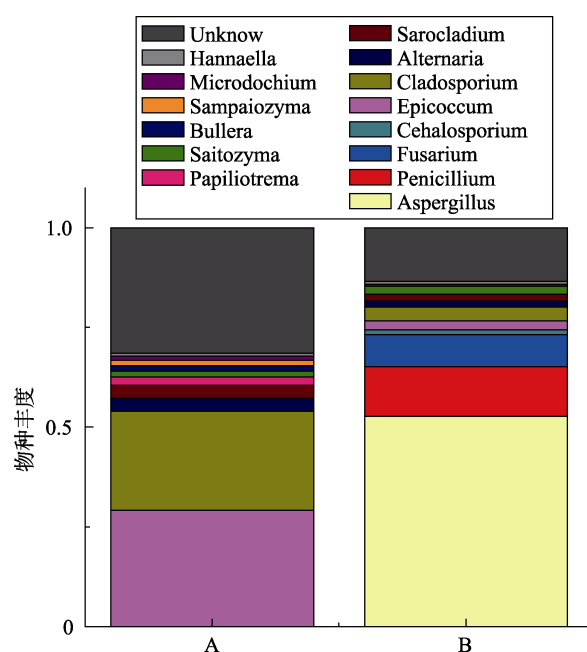


图 4 新采收 (A) 与储藏一年 (B) 的稻谷外部菌相分布

稻谷中的优势菌群。田间真菌多源自于水稻的生长环境,稻黑孢霉是稻曲病菌最主要的一种伴随菌,黑附球菌则来自于土壤和空气。田间真菌往往在收割过程中侵染谷物,在粮食入库时需要注意这一类真菌的生长<sup>[23]</sup>。为了贮藏谷物,需严格控制环境处于较低温湿度,而曲霉和青霉等的仓储型真菌往往有着耐高渗透压、耐干等特性,因此,这一类真菌逐渐转化为优势菌群。根据这种转变,殷蔚申等人<sup>[24]</sup>认为真菌菌系特点可以一定程度反应谷物的新鲜程度。

### 3 结论

仓库储藏一年后,稻谷中的优势菌群由多种田间真菌转变为曲霉类和青霉类的仓储型真菌,曲霉和青霉是危害稻谷仓储安全的主要霉菌种类。田间真菌侵染于收获到入库的过程中,且在储藏前期表现为优势菌群,控制稻谷入库时的水分状态往往可以有效控制此类真菌的生长;而以曲霉为代表的仓储型真菌是一类在干燥的环境下也可以生长的嗜干性霉菌,在储运时以此类霉菌为优势菌群的稻谷需要更多的关注。在运输时应有针对性地采取不同的防控手段和运输措施。

### 参考文献:

- [1] 姜长云. 关于解决当前粮食库存问题的思考[J]. 中国发展观察, 2016(14): 33-35+7.
- [2] 周建新, 鞠兴荣, 孙肖东, 等. 不同储藏条件下稻谷霉菌区系演替的研究[J]. 中国粮油学报, 2008(5): 133-136.
- [3] 负婷婷. 稻谷储藏中水分含量与霉变关系的研究[D]. 内蒙古农业大学, 2010.
- [4] 杨生瑞, 屈凌波, 孙长坡, 等. 黄曲霉菌株的分离、鉴定及产毒能力分析[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(6): 110-114+123.
- [5] 朱婷婷. 花生土壤中产黄曲霉毒素菌的分布、产毒力与毒素污染研究[D]. 中国农业科学院, 2018.
- [6] 吴红萍, 翟世博, 杜晨辉, 等. 海南省储粮稻谷的霉菌多样性分析[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(4): 138-141.
- [7] 奚萌, 周建新, 葛志文, 等. 高大平房仓稻谷粮层微生物、脂肪酸值和水分差异性研究[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(11): 59-61.
- [8] 和肖营, 都立辉, 陈达民, 等. 东北稻谷储藏期间霉菌生长趋势研究[J]. 粮食储藏, 2018, 47(1): 28-31+36.
- [9] 方宝庆, 葛志文, 高瑛琰, 等. 不同储藏时间稻谷在粮仓不同位置的品质及霉菌差异分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(10): 195-199.
- [10] JAYAS D S, WHITE N D G, MUIR W E. Stored-grain ecosystem[J]. Drying Technology, 1995, 13(4): 1045-1046.
- [11] 高洁. 雪莲菌菌相分析及抗癌活性研究[D]. 浙江大学, 2013.
- [12] 匡治州, 许杨. 核糖体 rDNA ITS 序列在真菌学研究中的应用[J]. 生命的化学, 2004(2): 120-122.
- [13] 吴清平, 黄龙花, 杨小兵, 等. 核酸序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(4): 959-961.
- [14] 李戌清, 傅鸿妃, 李红斌. 稻黑孢菌生物学特性及杀菌剂筛选[J]. 长江蔬菜, 2016(6): 80-84.
- [15] 张良, 刘好宝, 顾金刚, 等. 长柄木霉和泾阳链霉菌复配对烟苗生长及其抗病性的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24(10): 2961-2969.
- [16] 马存强, 王洪振, 周斌星, 等. 普洱茶固态发酵中转化咖啡碱为茶碱菌株的鉴定与应用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 119-124.
- [17] 王帅, 郭龙玉, 朱晓峰, 等. 聚多曲霉 Snf210 对南方根结线虫毒性的研究[J]. 植物保护, 2018, 44(6): 55-60.
- [18] 徐红, 廖万清, 温海, 等. 聚多曲霉菌致阻塞性支气管曲霉病一例[J]. 中华检验医学杂志, 2005(2): 95.
- [19] 杨发枝, 杨建勋, 熊吉奎. 聚多曲霉致皮肤感染一例报告[C]. 中国菌物学会菌物学学术讨论会. 2003.
- [20] 李扬, 王亚南, 胡同乐, 等. 黑附球菌在植物病害生物防治中的研究与应用进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(6): 2988-2990.
- [21] 詹耀, 王为民, 田凤, 等. 基于超高压的稻谷亮白曲霉杀菌效应及其萌发特性研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(11): 72-76+83.
- [22] 董丹, 关统伟, 车振明. 杂色曲霉最适生长条件及抗性实验研究[J]. 中国酿造, 2015, 34(4): 51-54.
- [23] 邵海燕, 王连平, 诸葛根樟. 农家稻谷贮藏期真菌区系和霉变损失研究[J]. 植物保护学报, 1992(1): 69-74.
- [24] 殷蔚申, 张耀东, 庄桂, 等. 我国稻谷真菌区系调查及其演替规律的研究[J]. 郑州粮食学院学报, 1986(3): 3-17. 完