

· 基础研究 ·

炮天雄传统炮制过程中微生物的分离与初步鉴定[△]胡梦^{1,2}, 杜杰³, 贾丹丹^{1,2}, 刘英^{1,2}, 胡海峰^{1,2*}

(1. 上海医药工业研究院, 上海 200040;

2. 国药集团健康产业研究院有限公司, 上海 201203; 3. 中国中药公司, 北京 100195)

[摘要] 目的: 揭示炮天雄传统炮制过程中的微生物菌群。方法: 应用经典微生物分离纯化方法, 结合形态学考察和 16S rDNA 或 18S rDNA 基因序列分析, 对炮天雄传统炮制过程中样品进行微生物的分离及菌种初步分类鉴定。结果: 共分离获得细菌 14 株、酵母菌 11 株、丝状真菌 2 株。14 种细菌分别为克雷伯氏菌属、肠杆菌属、节杆菌属、蜡样芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、形赖氨酸芽孢杆菌、伯格菌属、短黄杆菌、棒状杆菌属、嗜盐球菌、巨大芽孢杆菌、植物乳杆菌、乳酸乳球菌、食蜜魏斯氏菌; 11 种酵母菌分别为浅白色隐球酵母菌、胶红酵母菌、葡萄牙棒孢酵母、热带念珠菌、克鲁维毕赤酵母、毛孢子菌属、半乳糖霉菌、地丝菌属、巴氏毕赤酵母、假丝酵母属、白地霉菌; 2 种丝状真菌分别为产黄青霉菌、卷枝毛霉菌。结论: 炮天雄传统发酵炮制工艺涉及多种微生物共同参与发酵过程, 这一发现为研究炮天雄现代炮制工艺奠定了微生物菌种基础。

[关键词] 炮天雄; 炮制; 微生物; 分离; 鉴定

Identification and Isolation of Microorganisms from Processed *Aconitum Carmichaeli* Samples during Its ProcessingHU Meng^{1,2}, DU Jie³, JIA Dandan^{1,2}, LIU Ying^{1,2}, HU Haifeng^{1,2*}

(1. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040;

2. Sinopharm Health Industry Institute Co., Ltd, Shanghai 201203, China;

3. The Traditional Chinese Medical Company of China, Beijing 100195, China)

[Abstract] **Objective:** To reveal the beneficial microorganisms in Processed *Aconitum Carmichaeli* during its processing by traditional fermented methods. **Methods:** By classical microbial isolation and purification methods, the strains in Processed *Aconitum Carmichaeli* samples were isolated and purified. The preliminary taxonomy of the strains isolated was carried out by investigating the morphological properties, analyzing and comparing their 16S rDNA or 18S rDNA gene sequences. **Results:** 14 species of bacteria, 11 species of yeasts and 2 species of filamentous fungi were isolated and identified in Processed *Aconitum Carmichaeli* samples. The bacteria included *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Arthrobacter* spp., *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bergeyella* sp., *Empedobacter brevis*, *Corynebacterium* sp., *Salinicoccus hispanicus*, *Bacillus meqaterium partial*, *Weissella cibaria*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*. The yeasts included *Corynebacterium bovis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Clavispora lusitanae*, *Candida tropicalis*, *Pichia kluyveri*, *Trichosporon* spp., *Galactomyces geotrichum*, *Geotrichum* spp., *Pichia barkeri*, *Candida athensensis* spp., *Geotrichum candidum*, and the fungi are *Penicillium chrysogenum* and *Mucor circinelloides*. **Conclusion:** Many species of microorganisms exist in Processed *Aconitum Carmichaeli* samples during its processing, which help to reconstruct modern fermentation technology of Processed *Aconitum Carmichaeli*.

[Keywords] Processed *Aconitum Carmichaeli*; fermentation; microorganism; isolation; identification

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.5.012

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* De-
bx. 的子根加工品, 其中形长而细、重 50 g 以上者

习称“天雄”^[1]。炮天雄是附子的一种炮制品, 优
选大个附子采用传统炮制技术加工而成^[2]。其成品

[△] [基金项目] “十二五”重大新药专项(2014ZX09201001-005-001); 国家中医药管理局中医药行业专项(201507004)

* [通信作者] 胡海峰, 研究员, 研究方向: 微生物药物研究与开发; Tel: (021) 62892873, E-mail: haifenghu88@163.com

多为长圆锥形,顶端常有短残茎,中部多向一侧略膨大,色黄,清脆,切面无光泽,气微,味淡,性味辛。目前中国大陆使用较少,但港澳、东南亚地区仍习惯沿用炮天雄入方治疗元阳素虚、肾亏阳虚症。由于天雄药材生用毒性较大,临床应用前均须炮制,炮制方法各异^[3]。炮天雄的炮制工艺和临床药理关系密切,据报道其在加工过程中毒/效性成分大量流失,造成生物碱含量极低,甚至不能测出,能否保证临床疗效,值得进一步研究^[4]。炮天雄的现代研究较少,仅见药效、毒性、基原的相关研究^[5]。本文应用经典微生物分离纯化方法,分离并初步分类鉴定附子传统炮制品炮天雄中微生物菌群,为后续采用纯种或混种发酵改进炮天雄的现代炮制工艺奠定菌种基础。

1 仪器与材料

1.1 试剂

1.1.1 样品 炮天雄传统炮制不同阶段的中间品(四川江油中坝附子科技发展有限公司提供),其块根长圆锥形,稍弯曲,顶端常有短残茎,中部多向一侧略膨大,表面棕褐色或灰棕色,有小瘤状突起的支根。样品炮制共包括3个阶段:胆巴液浸泡发酵,清水浸漂和辅料浸泡发酵,晾干;含7个取样点(每隔两天换浸泡液前取样),采集时间为2016年4月6日—25日。样品炮制第一阶段含4个取样点,样品编号为J1-1、J1-2、J1-3、J1-4;第二阶段含1个取样点,样品编号为J2;第三阶段含2个取样点,样品编号为J3-1、J3-2。

1.1.2 其他试剂 LB培养基、MRS培养基、PDA培养基、高氏一号培养基(国药集团化学试剂有限公司);Fx KOD Buffer、脱氧核糖核苷三磷酸、dNTP、Fx KOD 酶、Easy Taq Buffer、Easy Taq 酶(TaKaRa公司);引物NS1、NS2(南京金斯瑞生物科技有限公司合成)。

1.2 仪器

电子天平(上海精科仪器有限公司);精密数显示酸度计(Sartorius);压力蒸气灭菌锅(上海华线医用核子仪器有限公司);超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司);生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);PCR扩增仪(德国Eppendorf公司)。

2 方法

2.1 分离及纯化培养基

2.1.1 LB培养基 添加甲醇溶解制霉菌素,过滤除菌,终质量浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,乳酸菌外细菌分离培养用。

2.1.2 MRS培养基 添加终质量浓度为 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溴甲酚绿指示剂,高压蒸气灭菌乳酸菌产酸使显色剂变黄,乳酸菌分离培养用。

2.1.3 PDA培养基 添加过滤除菌、终质量浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 硫酸链霉素,真菌分离培养用。

2.1.4 高氏一号培养基 添加过滤除菌、终质量浓度为 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 重铬酸钾,放线菌分离培养用。

2.2 微生物的分离与纯化

2.2.1 样品处理

2.2.1.1 样品稀释 取样品5 g,在无菌条件下加至装有45 mL无菌0.9%氯化钠溶液、含玻璃小珠的250 mL锥形瓶中,振摇约30 min,使菌分散,得稀释10倍菌悬液,采用10倍梯度稀释,得0.9%氯化钠溶液水稀释后菌悬液。

2.2.1.2 样品增菌培养 取样品约1 g,无菌条件下分别加入2.1分离培养基中,LB液体培养基于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养1.5 d,MRS液体培养基于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置培养1.5 d,PDA液体培养基于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养2.5 d。增菌后培养液采用10倍梯度稀释,得富集培养后稀释菌液。

2.2.2 微生物分离 分别吸取0.2 mL样品稀释后菌悬液,均匀涂布于2.1固体培养基。

2.2.3 菌株纯化 将LB培养基、MRS培养基置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养;将PDA培养基、高氏一号培养基置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养,将培养基表面长出的菌落进行平板划线,直到菌落形态一致。

2.3 菌株初步鉴定

2.3.1 形态学观察

2.3.1.1 菌落形态 用接种针取单菌落,细菌接种于LB培养基,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养;真菌接种于PDA培养基,置 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养,观察菌体在培养基中的菌落形态与生长情况。

2.3.1.2 显微形态 细菌用结晶紫染色,置于显微镜下观察细菌结构,同时进行革兰氏染色;酵母菌用美蓝染色,置于显微镜下观察;丝状真菌用插片法进行培养,待菌丝长过插片的位置后,取出盖玻

片进行显微镜观察。

2.3.2 16S rDNA/18S rDNA 分子生物学鉴定

2.3.2.1 16S rDNA 分子生物学鉴定 细菌菌落 PCR: 以菌落为模板, 上游引物 27F: 5' GAGAGTTTGATC-CTGGCTCAG3', 下游引物 1495R: 5'CTACGGCTAC-CTTGTACGA3', 完成 PCR 扩增。PCR 体系为 Fx KOD Buffer 10 μ L、dNTP 0.4 μ L、引物各 0.4 μ L、FX KOD 酶 0.4 μ L、DMSO 1 μ L、ddH₂O 10 μ L。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 预热 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 保持 10 min, 16 $^{\circ}$ C 保温。用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 结果进行验证, 将扩增产物进行测序并对结果进行序列分析^[5]。

2.3.2.2 18S rDNA 分子生物学鉴定 真菌以提取的基因组 DNA 为模板, 上游引物 NS1: 5' GTAGT-CATATGCTTGTCTC3', 下游引物 NS2: 5'GGCTGCT-GGCACCAGACTTGC3', 完成 PCR 扩增。基因组提取: 取培养的真菌一管, 装入细砂, 用 FastPrep 仪器进行操作 (5 m $\cdot$ s⁻¹, 10 s, 2 次)。然后加入 500 μ L DES 溶液和 5 μ L β -巯基乙醇, 混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。加入 500 μ L 水饱和苯酚-三氯甲烷-异戊醇 (25:24:1), 12 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 5 min。将上清液转移至 1.5 mL 离心管中, 再加 500 μ L 水饱和苯酚-三氯甲烷-异戊醇 (25:24:1), 沉淀 1 次。12 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 5 min 后, 将上清液转移至 1.5 mL 离心管中, 加入冷的 70% 乙醇混匀, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 2 h。12 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 5 min, 挥干残余的乙醇, 加入 TER 溶液溶解。PCR 体系为 Easy Taq Buffer 2.5 μ L、dNTP 1.0 μ L、引物各 1.0 μ L、Easy Taq 酶 0.1 μ L、DMSO 1.25 μ L、模板 0.5 μ L、ddH₂O 21 μ L。PCR 程序为 98 $^{\circ}$ C 预热 5 min, 96 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 90 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 保持 10 min, 16 $^{\circ}$ C 保温。用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 结果进行验证, 将扩增产物进行测序并对结果进行序列分析^[5]。

2.3.2.3 选取扩增结果阳性的产物进行测序 将 PCR 测序结果提交至 NCBI, 与 Gene Bank 数据库中已知基因序列进行 Blast 对比分析待测菌株与模式菌株的同源性。

3 结果与分析

通过对炮天雄炮制过程中不同时间点的样品进行分离, 总共得到细菌 14 种, 酵母菌 11 种, 丝状

真菌 2 种, 结合形态学和分子生物学对所分菌株进行综合鉴定。

3.1 细菌

3.1.1 细菌形态学特征

3.1.1.1 乳酸菌形态观察 各株乳酸菌在 MRS 平板上的菌落形态、细胞形态及革兰染色结果见表 1。

表 1 炮天雄传统炮制过程中所分离乳酸菌的形态特征

乳酸菌编号	菌落形态	细胞形态	革兰染色
L-1	浅蓝色、光滑、湿润、圆形	短杆状	++
L-2	奶白色、中间微凸、光滑、湿润、圆形	细杆状	++
L-3	浅蓝色、扁平、光滑、圆形	小球状	++

注: ++ 表示革兰氏阳性。

3.1.1.2 乳酸菌外细菌形态观察 各株细菌在 LB 平板上的菌落形态、细胞形态及革兰染色结果见表 2。

表 2 炮天雄传统炮制过程中所分离乳酸菌外细菌的形态特征

细菌编号	菌落形态	显微形态	革兰染色
B-1	白色、光滑、湿润、圆形	短杆状	--
B-2	透明光滑, 中间微凸, 圆形	小杆状	--
B-3	浅黄色、圆形、乳状突起、湿润	短杆状	--
B-4	肉色、扁平、干燥、表面微皱	直杆状	++
B-5	肉色、扁平、突起、干燥, 边缘微皱	直杆状	++
B-6	浅黄色、湿润、水滴状、无规则	直杆状	++
B-7	白黄色、中间凹陷微空, 湿润、圆形	球状	++
B-8	淡黄色, 湿润, 圆形小点	短杆状	--
B-9	深黄色、湿润、圆形小点	棒杆状	++
B-10	粉红色、湿润、圆形小点	小球状	--
B-11	略透明色、扁平, 干燥, 褶皱	直杆状	++

注: -- 表示革兰氏阴性; ++ 表示革兰氏阳性。

3.1.2 细菌种属初步鉴定

3.1.2.1 乳酸菌种属初步鉴定 将 PCR 测序结果提交至 NCBI, 与 Gene Bank 数据库中已知基因序列进行 Blast 对比, 分析待测菌株与模式菌株的同源性。根据乳酸菌菌株的 16S rDNA 序列比对分析结果及其形态学特征, 并结合《细菌鉴定手册》和《微生物分类学》等有关资料, 对所分乳酸菌进行初步鉴定。见表 3。

表 3 炮天雄传统炮制过程中所分离乳酸菌种属初步鉴定

菌株编号	菌属名称
L-1	<i>Weissella cibaria</i> 乳酸菌科魏斯氏菌属食蜜魏斯氏菌
L-2	<i>Lactobacillus plantarum</i> 乳杆菌科乳杆菌属植物乳杆菌
L-3	<i>Lactococcus lactis</i> 乳酸菌科乳球菌属乳酸乳球菌

3.1.2.2 乳酸菌外细菌种属初步鉴定 根据细菌菌株的 16S rDNA 序列比对分析结果及其形态学特征,并结合《细菌鉴定手册》和《微生物分类学》等有关资料,对所分细菌进行初步鉴定。见表 4。

3.2 真菌

3.2.1 酵母菌形态学特征 各酵母菌在 PDA 平板上的菌落形态及显微观察情况见表 5。

表 4 炮天雄传统炮制过程中所分离乳酸菌外细菌种属初步鉴定结果

菌株编号	鉴定结果
B-1	<i>Klebsiella</i> sp 克雷伯氏菌属
B-2	<i>Enterobacter</i> spp 肠杆菌科肠杆菌属肠杆菌属
B-3	<i>Raoultella</i> spp 芽孢杆菌科节杆菌属
B-4	<i>Bacillus cereu</i> 芽孢杆菌科芽孢杆菌属蜡样芽孢杆菌
B-5	<i>Bacillus pumilus</i> 芽孢杆菌科芽孢杆菌属短小芽孢杆菌
B-6	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> 芽孢杆菌科芽孢杆菌属赖氨酸芽孢杆菌
B-7	<i>Bergeyella</i> sp 伯格菌属
B-8	<i>Empedobacter brevis</i> 黄杆菌科黄杆菌属短黄杆菌
B-9	<i>Corynebacterium</i> sp 放线菌科棒状杆菌属
B-10	<i>Salinicoccus hispanicus</i> 嗜盐菌科嗜盐球菌属嗜盐球菌
B-11	<i>Bacterium anthracoides</i> 芽孢杆菌科芽孢杆菌属巨大芽孢杆菌

表 5 炮天雄传统炮制过程中所分离酵母菌的形态特征

菌株编号	菌落形态	显微观察
Y-1	奶油色,光滑,湿润粘稠、圆形	菌体呈球形,多边芽殖
Y-2	亮红色、光滑、湿润粘稠、圆形,产红色不溶色素	菌体呈长形,多边芽殖
Y-3	白色、光滑、圆形,奶酪状	菌体短椭圆形,多边芽殖,子囊孢子呈球形
Y-4	白色,中间乳状突起、光滑圆形	菌体呈棒槌状
Y-5	白色,中间突起,表面微褶,粗糙	菌体呈柱形,多边芽殖,子囊孢子呈球形
Y-6	白色,中间凸起,四周扁平,菌体粘稠圆形	菌体椭圆形
Y-7	乳酪色,中间白色凸起,四周菌体呈发射状,周围有透明圈	产菌体呈长形,产关节孢子,有假菌丝
Y-8	表面短毛绒,中间凹陷,四周凸起,白色,嵌入培养基表面下层	隔断形成关节孢子,呈直角形
Y-9	白色,中间凸起,圆形湿润	菌体呈椭圆形,多别芽殖,子囊孢子呈帽形
Y-10	白色,中间凸起,四周凹陷,圆形奶酪状	菌体呈卵形,出芽生殖
Y-11	白色,中间微凸,四周呈细粉状	菌体呈圆形,有圆筒形节孢子,有假菌丝

3.2.2 酵母菌的初步鉴定 酵母菌菌属鉴定结果见表 6。

表 6 炮天雄传统炮制过程中所分离酵母菌菌属初步鉴定

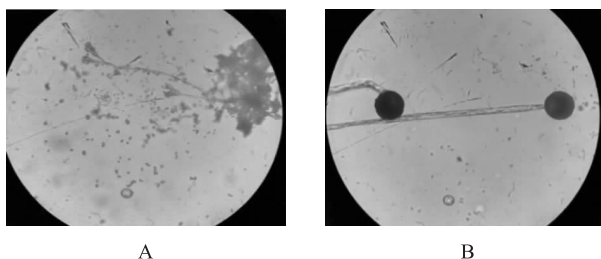
菌株编号	菌属名称
Y-1	<i>Corynebacterium bovis</i> 隐球酵母亚科隐球酵母属浅白色隐球酵母菌
Y-2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 红酵母亚科红酵母属胶红酵母菌
Y-3	<i>Clavispora lusitaniae</i> 丝孢科棒孢属葡萄牙棒孢酵母
Y-4	<i>Candida tropicalis</i> 隐球酵母科念珠菌属热带念珠菌
Y-5	<i>Pichia kluyveri</i> 酵母亚科毕赤酵母属克鲁维毕赤酵母
Y-6	<i>Trichosporon</i> sp 链孢霉科毛孢子菌属
Y-7	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain 丛梗孢科地霉属半乳糖霉菌
Y-8	<i>Geotrichum</i> sp 隐球酵母科地丝菌属
Y-9	<i>Pichia barkeri</i> 酵母亚科毕赤酵母属巴氏毕赤酵母
Y-10	<i>Meyerozyma</i> sp. <i>Candida athensensis</i> sp 隐球酵母亚科假丝酵母属
Y-11	<i>Geotrichum candidum</i> 丛梗孢科地霉属白地霉菌

3.2.3 丝状真菌形态学特征

3.2.3.1 菌落形态及插片镜检结果 各丝状真菌在 PDA 平板上的菌落形态及插片镜检结果见表 7,显微形态见图 1。

表 7 炮天雄传统炮制过程中所分离丝状真菌的形态特征

真菌编号	菌落形态	显微观察
F-1	辐射状皱纹,边缘菌丝体白色,质地绒状,分生孢子结构大量,蓝绿色,有些许浅黄色渗出液和可溶性色素,菌落反面呈浅黄褐色	分生孢子梗呈对称或不对称扫帚状,具有横隔的透明菌丝
F-2	白色绒状菌丝,黑色孢子,产黄色不溶色素	球形顶生孢子囊生于直立的孢子梗上,孢子囊大,孢囊梗直接由菌丝体生出,不成束



注：A. 真菌 F-1；B. 真菌 F-2。

图 1 真菌显微镜检图

3.2.3.2 丝状真菌初步鉴定 根据真菌菌株的 18s rDNA 序列同源性比对分析结果及其形态学特征，并结合《真菌鉴定手册》和《微生物分类学》等有关资料，对所分丝状真菌进行初步鉴定，鉴定结果见表 8。

表 8 炮天雄传统炮制过程中所分离丝状真菌菌属初步鉴定

丝状真菌编号	菌株名称
F-1	<i>Penicillium chrysogenum</i> 丛梗孢科青霉属产黄青霉菌
F-2	<i>Mucor circinelloides</i> 毛霉科毛霉属卷枝毛霉菌

3.3 不同炮制阶段微生物菌群的变化

炮天雄的不同炮制阶段样品中微生物菌群变化情况见表 9。

表 9 炮天雄传统炮制过程中微生物菌群

样品编号	微生物种类
J1-1 细菌：B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6、B-8、B-9、B-10、B-11 乳酸菌：L-1、L-2、L-3 酵母菌：Y-1、Y-2、Y-3、Y-4	
J1-2 细菌：B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6、B-8、B-9、B-10、B-11 乳酸菌：L-1、L-2、L-3 酵母菌：Y-2、Y-3、Y-5、Y-6、Y-7	
J1-3 细菌：B-1、B-2、B-3、B-4、B-6、B-8、B-9、B-11 乳酸菌：L-1、L-2、L-3 酵母菌：Y-2、Y-3、Y-4、Y-6	
J1-4 细菌：B-1、B-2、B-3、B-4、B-6、B-8 乳酸菌：L-1、L-2、L-3 酵母菌：Y-1、Y-2、Y-3、Y-4、Y-7 丝状真菌：F-1、F-2	
J2 细菌：B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6、B-7、B-9、B-10、B-11 乳酸菌：L-1、L-2、L-3 酵母菌：Y-1、Y-2、Y-8、Y-11 丝状真菌：F-2	
J3-1 细菌：B-2、B-3、B-5、B-7、B-8、B-11 乳酸菌：L-1、L-2、L-3 酵母菌：Y-1、Y-2、Y-3、Y-8、Y-9、Y-11 丝状真菌：F-2	
J3-2 细菌：B-1、B-2、B-3 乳酸菌：L-1、L-2、L-3 酵母菌：Y-1、Y-2、Y-3、Y-8、Y-10、Y-11 丝状真菌：F-2	

由表 9 可见，乳酸菌 L-1 ~ L-3 出现在炮天雄整个炮制过程中。乳酸菌外细菌的种类在样品炮制过程中呈现递减趋势，其中菌株 B-1、B-2、B-3 约在整个炮制过程中出现，而细菌 B-10 仅在样品炮制第一阶段的 J1-1 样品中分离得到。酵母菌的种类在整个炮制过程中变化较大，在炮制的第一阶段主要菌株为 Y-1 ~ Y-3，在炮制第二、三阶段主要新增菌株 Y-8、Y-11。丝状真菌 F-2 在样品炮制第一阶段后期及炮制第二、三阶段被分离得到，丝状真菌 F-1 仅在样品的炮制第一阶段后期分离得到。

4 结论与讨论

在炮天雄炮制品的取样、包装、运输、所含微生物的分离及其分子鉴定等过程中，均在无菌操作条件下进行，确保实验中所分离的菌株非外源性杂菌。从炮天雄不同炮制阶段样品中共分离得到 14 种细菌、11 种酵母菌和 2 种丝状真菌，结合微生物菌落形态特征、显微形态及 16s rDNA/18s rDNA 分子序列比，对这些微生物进行初步鉴定。剔除同种菌株后，炮天雄炮制过程中分离得到微生物，乳酸菌包括：植物乳杆菌、乳酸乳球菌、食蜜魏斯式菌；乳酸菌外细菌包括：克雷伯氏菌属菌、肠杆菌、节杆菌属菌、短黄杆菌、肾棒状杆菌、嗜盐球菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、形赖氨酸芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌及伯格菌属菌；酵母菌包括克鲁维毕赤酵母菌、巴氏毕赤酵母菌、葡萄牙棒孢酵母、浅白色隐球酵母、胶红酵母菌、热带念珠菌、假丝酵母菌属菌、半乳糖霉菌、白地霉菌、地丝菌属菌、毛孢子菌属菌；丝状真菌包括产黄青霉菌、卷枝毛霉菌。样品中所分离到的蜡样芽孢杆菌及巨大芽孢杆菌均具有产蛋白酶、淀粉酶活性，其中巨大芽孢杆菌还具有产明胶酶、尿素酶能力。

植物乳杆菌、乳酸乳球菌、食蜜魏斯式菌、克雷伯氏菌属菌、肠杆菌、节杆菌属菌、白色隐球酵母菌、胶红酵母菌、葡萄牙棒孢酵母在炮天雄整个炮制阶段均有出现。卷纸毛霉菌在样品炮制第一阶段后期及炮制第二、三阶段被分离得到。

炮天雄的传统炮制采用胆巴液(以氯化钙为主)浸泡数日，人体摄入胆巴液过量，不仅会抵消附子的温热药性，损伤人体阳气，甚至出现中毒症状^[6]，同时采用流水多次退胆亦会造成有效乌头碱的流失。

(下转第 692 页)

- 的初步分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1734-1737.
- [4] Vitullo M, Ripabelli G, Fanelli I, et al. Microbiological and toxicological quality of dried herbs[J]. Lett Appl Microbiol, 2011, 52(6): 573-580.
- [5] 王文丽, 徐晖, 陈慧芝, 等. 15 种中药材表面污染真菌的分离与分子鉴定[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12): 1910-1914.
- [6] Hashem M, Alamri S. Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi[J]. Saudi J Boil Sci, 2010, 17(2): 167-175.
- [7] Singh P, Srivastava B, Kumar A, et al. Fungal contamination of raw materials of some herbal drugs and recommendation of *Cinnamomum camphora* oil as herbal fungitoxicant[J]. Microbial Ecol, 2008, 56(3): 555-560.
- [8] Chen A J, Jiao X, Hu Y, et al. Mycobiota and mycotoxins in traditional medicinal seeds from China[J]. Toxins, 2015, 7(10): 3858-3875.
- [9] Ahmad B, Ashiq S, Hussain A, et al. Evaluation of mycotoxins, mycobiota, and toxigenic fungi in selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan[J]. Fungal Biol, 2014, 118(9): 776-784.
- [10] Zheng R, Wang W, Tan J, et al. An investigation of fungal contamination on the surface of medicinal herbs in China[J]. Chin Med, 2017, 12(1): 1-8.
- [11] 齐祖同. 中国真菌志·曲霉属及其相关有性型: 第5卷[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [12] 孔华忠. 中国真菌志·青霉属及其相关有性型属: 第35卷[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [13] 张初署, 刘阳, 邢福国, 等. 七种培养基对黄曲霉分离效果的比较[J]. 核农学报, 2013, 27(2): 208-212.
- [14] 宋美芳, 张忠廉, 李学兰. 3 种云南主产中药材上污染真菌在贮藏过程中的变化[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 955-957.
- [15] 李汶, 庄学聪. ELISA 法检测常用中药黄曲霉毒素 B₁[J]. 中国药事, 2000, 14(2): 101-102.
- [16] 李延生, 陈建民. ELISA 试剂盒定量检测中药材和中成药的黄曲霉毒素 B₁[J]. 中草药, 2000, 31(8): 586-587.
- [17] 郑荣, 毛丹, 王少敏, 等. 11 种中药材中黄曲霉毒素 G₂, G₁, B₂, B₁ 的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(5): 368-372.
- [18] 郝爱鱼, 赵丽元, 刘英慧, 等. HPLC 柱后光衍生荧光法测定中药饮片中的黄曲霉毒素残留量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(12): 2203-2207.
- [19] 谭婧, 郑润生, 王文丽, 等. 中药饮片中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮的液质联用检测分析[J]. 时珍国医国药, 2013, 23(10): 2469-2472.

(收稿日期 2017-02-13)

(上接第 656 页)

在目前针对炮天雄及其炮制品中所含乌头类生物碱量及其药理活性研究较多, 而对炮天雄传统炮制品中微生物菌群及如何利用菌株发酵转化附子降低双酯型乌头碱的毒性的研究甚少。魏婷婷等^[7] 通过从 60 份土壤中定向筛选, 获得菌株 SIPI-18-5 (节杆菌属 *Arthrobacter* sp), 可将乌头碱转化为单酯型或毒性更小的化合物。本实验室分离得到节杆菌属菌株 B-3, 其菌落形态及显微形态均与菌株 SIPI-18-5 类似, 需要进一步实验验证是否具该种生物转化功能。从理论上来说, 凡是能够产生酯酶对酯类物质产生水解反应的微生物种类都可以作为炮天雄生物转化的菌种。吴丽等^[8] 采用霉菌类 (青霉菌、黑曲霉、毛霉菌) 菌种生物转化附子, 转化后附子中的双酯型乌头碱较生附子中的含量变化较大, 并产生多个新组分。

本实验为研究采用微生物转化炮天雄中的双酯型乌头碱达到减毒增效的作用提供了菌种基础, 同时也为减少炮天雄炮制过程中胆巴液的使用量和浸泡时间提供了可能性。

参考文献

- [1] 张德昌. 对药材天雄基源的商讨[J]. 中药材, 1985(1): 46.
- [2] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药饮片炮制规范[S]. 2015 年版. 成都: 四川科学技术出版社, 2016: 127.
- [3] 曹晖, 王春燕, 王孝涛. 毒性中药天雄炮制历史沿革研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(6): 34.
- [4] 曹晖. 中药天雄炮制品的生物碱含量及其急性毒性 (LD₅₀) 变化的初步研究[M]. 基层中药杂志, 1993, 7(2): 27.
- [5] 张德昌. 对天雄基源的商讨[M]. 中药材, 1985, 2(1): 46.
- [6] 周林, 李飞, 任玉珍, 等. 附子中生物碱含量与在胆巴液中浸泡时间变化规律的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 724.
- [7] 魏婷婷, 胡海峰. 乌头碱转化菌的筛选及发酵工艺初步优化[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(8): 726.
- [8] 吴丽, 何宇新. 基于生物转化技术进行附子减毒增效的研究[D]. 成都: 西华大学, 2012.

(收稿日期 2016-09-22)