

螺蛳粉米粉表面污染霉菌的分离鉴定

刘群^{1,2}, 熊小迪¹, 刘兴^{2,3}, 林华^{2,3}, 李丽^{1,2}, 张李香⁴, 陈乃中^{1,2}, 刘涛^{1,2*}

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)(2. 柳州螺蛳粉质量安全联合实验室, 广西柳州 545001)(3. 柳州市质量检验检测研究中心, 广西柳州 545001)(4. 黑龙江大学现代农业与生态环境学院, 黑龙江哈尔滨 150080)

摘要: 螺蛳粉米粉加工储藏过程中的霉菌污染会影响米粉品质。为明确螺蛳粉米粉上霉菌的生物多样性, 该研究以柳州螺蛳粉干米粉为样品, 对其表面霉菌种类进行了分离鉴定及菌落形态、孢子萌发、菌丝生长等生物学特性分析。通过 ITS-rDNA 测序及 NCBI 序列比对, 分离获得的 32 株真菌可以分为 11 个属, 其中青霉属 (*Penicillium* sp.) 占 6.3%、枝孢属 (*Cladosporium* sp.) 占 40.6%、链格孢属 (*Alternaria* sp.) 占 9.4%、曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 占 9.4%、篮状菌属 (*Talaromyces* sp.) 占 9.4%, 以上是米粉表面主要的优势真菌; 系统发育树表明, 分离获得的真菌同已知真菌序列相似度均达 99% 以上; 对优势真菌孢子萌发和菌丝生长测定发现, 青霉属真菌具有较快的孢子萌发率和菌丝扩展率, 而曲霉属和枝孢属真菌虽然菌丝蔓延较快, 但前期产孢较少。该研究首次对米粉表面霉菌种类进行分离鉴定的报道, 研究结果表明, 米粉上污染的霉菌种群多样性较高, 存在一定的食品质量安全风险, 研究结果可为米粉霉菌污染控制消除技术开发提供借鉴。

关键词: 米粉; 霉菌污染; 分离鉴定; 优势菌株; 生长特性

文章编号: 1673-9078(2024)10-146-153

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.1169

Isolation and Identification of Molds on the Surface of River Snail Rice Noodles

LIU Qun^{1,2}, XIONG Xiaodi¹, LIU Xing^{2,3}, LIN Hua^{2,3}, LI Li^{1,2}, ZHANG Lixiang⁴, CHEN Naizhong^{1,2}, LIU Tao^{1,2*}

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China) (2. Liuzhou River Snail Rice Noodle Quality and Safety Joint Laboratory, Liuzhou 545001, China) (3. Liuzhou Quality Inspection and Testing Research Center, Liuzhou 545001, China) (4. College of Advanced Agriculture and Ecological Environment, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract: Mold contamination can adversely affect the quality of river snail rice noodles. To clarify the mold biodiversity, molds on the surface of river snail rice noodles were isolated and identified, and their growth characteristics (colony morphology, spore germination, and mycelial growth) were analyzed. Comparison of ITS-rDNA sequences and NCBI sequences revealed the isolation of 32 mold species under 11 mold genera, with five dominant mold species identified, namely *Penicillium* sp. (6.3%), *Cladosporium* sp. (40.6%), *Alternaria* sp. (9.4%), *Aspergillus* sp. (9.4%), and *Talaromyces*

引文格式:

刘群,熊小迪,刘兴,等.螺蛳粉米粉表面污染霉菌的分离鉴定[J].现代食品科技,2024,40(10):146-153.

LIU Qun, XIONG Xiaodi, LIU Xing, et al. Isolation and identification of molds on the surface of river snail rice noodles [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 146-153.

收稿日期: 2023-09-27

基金项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费 (2022JK48); 柳州市质量检验检测研究中心自主科技项目 (LZZJZX-KJ-220002); 国家市场监督管理总局技术保障专项“食品储运生物污染控制专项”

作者简介: 刘群 (1991-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 生物污染物控制和食品保鲜, E-mail: liuq@caiq.org.cn

通讯作者: 刘涛 (1981-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品质量安全控制与保鲜, E-mail: liutao_caiq@126.com

sp. (9.4%). The phylogenetic tree showed that these isolates exhibited high similarity (>99%) with the known mold species. *Penicillium* sp. exhibited the highest spore germination and mycelial growth rates, whereas *Aspergillus* sp. and *Cladosporium* sp. exhibited low spore germination rates during the early stage despite their high mycelial growth rates. To the best of our knowledge, this is the first report on the isolation and identification of molds on the surface of river snail rice noodles, revealing a variety of mold species on the surface of rice noodles that indicate potential risks in food quality and safety. The findings of this study can facilitate the development of intervention technology for eliminating mold contamination in river snail rice noodles.

Key words: rice noodles; mold contamination; isolation and identification; dominant strain; growth characteristics

霉菌 (Moulds) 广泛存在于自然界中, 由于菌丝体发达、孢子多而轻, 常附着于谷物、奶制品、果品、蔬菜等表面, 造成食品腐败, 带来经济损失^[1]。此外, 一些霉菌如黄曲霉、链格孢菌、扩展青霉、镰刀菌等还会产生真菌毒素, 若不慎被误食会对人体产生急性毒性、慢性毒性和细胞毒性等危害^[2,3]。食品上霉菌污染的防控与消除已成为世界范围内面临的公共卫生安全问题^[4], 对霉菌污染物种类进行分离鉴定及生物学特性研究是开发霉菌控制消除技术的前提。

目前, 国内外学者在食源性霉菌污染物的分离鉴定方面已开展大量研究工作。坚果类产品储藏不当易受霉菌侵染, Jogee 等^[5]对花生上污染的霉菌进行分离鉴定发现, 曲霉属 (*Aspergillus* sp.)、青霉属 (*Penicillium* sp.) 和壳孢菌 (*Macrophoma phaseolina*) 是主要种类, 在分离获得的 31 株黄曲霉菌株中 (占总分离菌株的 57.4%), 有 9 株具备产真菌毒素能力。为研究不同乳酪上的微生物多样性, Nabaraj 等^[6]对 44 种乳酪上的霉菌进行了分离鉴定, 研究表明 *Penicillium roqueforti* 是乳酪上最常见的霉菌, 乳酪类型同霉菌的种类并没有很强的关联性。农业经济作物营养丰富, 采收、储运中容易受到环境中的霉菌污染而失去经济价值。Célestin 等^[7]从玉米和高粱中分离出串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*), 豌豆中分离出赭曲霉 (*Aspergillus ochraceus*) 和文氏曲霉 (*Aspergillus wentii*), 木薯粉中分离得到桔青霉 (*Penicillium citrinum*)、顶青霉 (*Penicillium corylophilum*) 和产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)。童军茂等^[8]通过对新疆哈密瓜采收后冷藏过程中自然发病的果实进行病原菌的分离筛选, 明确了引起采收后哈密瓜腐烂的主要病原菌为镰孢属 (*Fusarium* sp.)、葡萄穗霉属 (*Stachybotrys* sp.)、青霉属 (*Penicillium* sp.)、赤霉属 (*Gibberella* sp.)。米粉作为一种方便速食产品, 深受消费者喜爱; 柳州螺蛳粉产业更是作为地方特

色产业在国家政策支持下蓬勃发展。2021 年 4 月 26 日, 习近平总书记到柳州视察, 对螺蛳粉产业作出了重要指示, 要求推进螺蛳粉产业标准化、品牌化, 推动地方特色产业的高质量发展。然而, 螺蛳粉霉菌超标的现象时有发生^[9], 霉菌超标不仅带来食品质量安全问题, 更阻碍了柳州螺蛳粉特色产业的高质量发展。当前尚未有螺蛳粉米粉上霉菌污染物分离鉴定的研究, 已有研究多是对螺蛳粉中重金属元素的测定^[10]、亚硝酸盐的清除^[11]、螺蛳粉配料成分及风味的改善^[12]等。因此, 对螺蛳粉米粉上污染的霉菌种类进行分离鉴定, 对于米粉质量安全控制技术的开发具有重要意义。

本研究以预包装螺蛳粉中的米粉作为试验材料, 对不同批次米粉表面的霉菌污染物进行分离与纯化, 通过 ITS 序列分析技术结合传统的形态学观察对米粉上的霉菌进行了鉴定, 明确了螺蛳粉米粉上霉菌污染物的微生物种群组成, 并对其主要污染微生物的生长特性进行了研究, 以期对螺蛳粉米粉上霉菌污染物控制技术的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂

预包装螺蛳粉来自于市场抽检取样, 所有样品均低温避光保存; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato Dextrose, PDA), 北京陆桥技术股份有限公司; 培养皿 (90 mm) 和细胞滤网 (40 μm, Nylon), 兰杰柯科技有限公司; 乳酸酚棉蓝染色液, 索莱宝科技有限公司; PCR 扩增酶 Master Mix, 诺唯赞生物科技股份有限公司; 霉菌裂解液, 宝日医生物技术 (北京) 有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

DNA Engine Dyad PCR 核酸扩增仪、ZBS-ZY-0035

凝胶电泳仪、Gel Doc XR 凝胶成像仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; Eppendorf Thermo Mixer Comfort 舒适型恒温混匀仪、Eppendorf Centrifuge 5417R 高速冷冻离心机, 艾本德(上海)国际贸易有限公司; ZEISS Imager.A1 荧光正置显微镜, 卡尔蔡司(上海)有限公司。

1.2 螺蛳粉米粉表面霉菌的分离纯化

1.2.1 螺蛳粉米粉的处理方法

参考国标 GB 4789.15-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验霉菌和酵母计数》, 并适当调整。分别称取 25 g 不同厂家、不同批次的螺蛳粉干米粉, 用灭菌的剪刀剪成 3 cm 左右长条, 加入 225 mL 无菌生理盐水, 使用拍击式均质器拍打 3~5 min, 制成 1:10 的米粉洗脱物样品匀液。将样品匀液用灭菌的生理盐水做 10 倍梯度稀释, 制成 1:100 的样品匀液, 以此类推, 制备不同稀释浓度的样品匀液, 备用。

1.2.2 螺蛳粉米粉表面霉菌的分离纯化及保存

吸取 100 μ L 制备好的样品匀液, 涂布于 PDA 培养基上, 恒温培养箱中 28 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d, 直至肉眼能看到真菌菌落。将不同形态的菌落转接于新制备的 PDA 培养皿中, 转接纯化三次, 获得纯菌落。使用接种环挑取纯化后的真菌菌丝接种于 PDA 斜面试管中 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 螺蛳粉米粉表面霉菌的分子鉴定

1.3.1 霉菌裂解及 ITS 扩增

霉菌的裂解参照试剂盒 Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR (9164, Takara) 说明书操作。挑取少量菌丝于 1.5 mL 离心管中, 加入 50 μ L 裂解液, 放入匀质振荡仪中 80 $^{\circ}$ C、1 200 r/min 恒温振荡 15 min。使用冷冻离心机 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 1 min, 取上清液备用。使用通用引物 ITS1 和 ITS4^[13]对核糖体转录间隔区 ITS 进行 PCR 扩增, 引物序列 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', 扩增后的产物长度约 500~700 bp, 送北京睿博生物技术公司进行序列测定。

1.3.2 PCR 扩增体系及条件

PCR 扩增体系为 50 μ L, 包含 4 μ L 模板、2 μ L ITS1 (10 μ mol/L)、2 μ L ITS4 (10 μ mol/L)、25 μ L Master Mix 和 17 μ L 去离子水。PCR 反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 15 s,

72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共设置 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。

1.3.3 系统发育树构建

测序获得的序列在 NCBI 中利用 BLAST 进行序列相似性比对, 对测序真菌的属进行确定。将测序获得的 ITS 序列同比对后获得的菌种相关信息提交到 GenBank 数据库 (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/genbank/>) 进行审核, 并获取 GenBank 登录号。基于测序获得的 ITS 序列, 使用 MEGA X 软件, 选择邻接法 (Neighbor-joining) 进行系统发育树的构建及分析^[14]。

1.4 螺蛳粉米粉表面霉菌的生物学特性

1.4.1 孢子悬液的制备

孢子悬液的制备根据先前研究并作适当修改^[15]。取 3 mL 无菌生理盐水加入培养 3~5 d 的霉菌培养皿中, 轻轻刮下菌丝及孢子, 充分混匀后利用细胞滤网过滤得到孢子悬液。利用血球计数板对孢子悬液进行显微镜计数, 计算孢子悬液浓度, 制备好的一定浓度的孢子悬液于 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.4.2 霉菌形态观察

将制备好的孢子悬液 (每毫升 10^7 个孢子), 吸取 2 μ L 滴于 PDA 固体培养皿中, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 7 d, 7 d 后对菌落形态特征进行观察和记录。观察菌落表面纹饰、大小、形态、高度、颜色等, 利用显微镜观察孢子、孢子囊、孢子梗、菌丝等的大小、颜色、形状等^[16]。

1.4.3 孢子萌发的观察

孢子萌发的观察参考 Li 等^[17]的方法, 并稍作修改。制备孢子浓度为每毫升 10^7 个的孢子悬液, 取 500 μ L 孢子悬液加入含有 2.5 mL PDB 培养基的试管中, 恒温震荡摇床 28 $^{\circ}$ C, 200 r/min 连续培养。每隔 2 h 取样 1 次, 乳酸酚棉蓝染色后, 高倍显微镜观察记录孢子萌发状态。芽管长度与孢子直径相等或超过孢子直径时, 表示孢子已经萌发。芽管长度大于孢子直径 2 倍后停止培养观察。

1.4.4 菌丝的生长蔓延

制备孢子悬液并调整孢子悬液浓度为每毫升 10^7 个孢子。取 2 μ L 制备好的孢子悬液滴于 PDA 培养皿中央。28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱, 倒置培养。每天同一时间记录菌丝蔓延情况, 采用十字交叉法测定菌落直径并对进行拍照记录, 每组实验重复三次。

表 1 螺蛳粉表面分离出的不同属霉菌的比对结果

Table 1 Phylogenetic information of ITS-rDNA of 32 independent isolates from rice noodles

GenBank No.	Strain No.	Genus/BLAST	Query Cover/%	Per. Ident/%	GenBank No.	Strain No.	Genus/BLAST	Query Cover/%	Per. Ident/%
OR576729.1	3810-1	<i>Didymella</i> sp.	94	99.79	OR576743.1	4885-3	<i>Cladosporium</i> sp.	98	100.00
OR576730.1	3810-2	<i>Cladosporium</i> sp.	100	99.61	OR579100.1	3810*-1	<i>Trichosporon</i> sp.	99	99.22
OR539222.1	4027-1	<i>Cladosporium</i> sp.	100	100.00	OR579101.1	4027*-1	<i>Penicillium</i> sp.	98	99.64
OR576731.1	4027-2	<i>Didymella</i> sp.	95	99.39	OR579102.1	4027*-2	<i>Talaromyces</i> sp.	99	99.64
OR539281.1	4027-3	<i>Alternaria</i> sp.	100	100	OR579103.1	4027*-3	<i>Aspergillus</i> sp.	99	99.26
OR576732.1	4027-4	<i>Aspergillus</i> sp.	99	99.45	OR579104.1	4027*-5	<i>Talaromyces</i> sp.	98	99.12
OR576733.1	4027-5	<i>Aspergillus</i> sp.	100	99.45	OR579105.1	4027*-6	<i>Talaromyces</i> sp.	96	99.64
OR576734.1	4103-1	<i>Cladosporium</i> sp.	99	100.00	OR579106.1	4027*-11	<i>Aspergillus</i> sp.	98	99.47
OR576735.1	4103-4	<i>Cladosporium</i> sp.	98	99.61	OR579107.1	4027*-12	<i>Cladosporium</i> sp.	100	100.00
OR576736.1	4203-1	<i>Alternaria</i> sp.	99	100	OR579108.1	4103*-1	<i>Hypoxylon</i> sp.	99	99.25
OR576737.1	4203-2	<i>Alternaria</i> sp.	98	100.00	OR579109.1	4103*-2	<i>Penicillium</i> sp.	99	99.81
OR576738.1	4203-3	<i>Periconia</i> sp.	97	99.44	OR579110.1	4203*-1	<i>Nothophoma</i> sp.	97	100.00
OR576739.1	4652-1	<i>Cladosporium</i> sp.	99	99.61	OR579111.1	4363*-1	<i>Cladosporium</i> sp.	99	99.43
OR576740.1	4652-2	<i>Cladosporium</i> sp.	99	100.00	OR579112.1	4652*-1	<i>Cutaneotrichosporon</i> sp.	98	99.60
OR576741.1	4885-1	<i>Cladosporium</i> sp.	99	99.80	OR579113.1	4652*-11	<i>Cladosporium</i> sp.	99	100.00
OR576742.1	4885-2	<i>Cladosporium</i> sp.	98	100.00	OR579114.1	4885*-1	<i>Cladosporium</i> sp.	99	100.00

1.5 数据统计与分析

采用 Microsoft Excel 2020 统计整理相关数据, 使用 Origin Pro 9.0 进行作图。每个实验设置三个平行, 实验数据表示为“平均值 ± 标准偏差”的形式。

2 结果与讨论

2.1 螺蛳粉米粉表面霉菌的分子生物学鉴定

对分离纯化获得的 32 株菌株样本进行 ITS 序列扩增, 得到长约 500~700 bp 的单一片段 (补充材料)。测序后的 ITS 序列使用 BLAST 功能对比发现, 所有的菌株样本均能匹配到相似度达 99% 以上的序列 (表 1), 说明螺蛳粉米粉上的真菌均为已知真菌。在分离获得的菌株中, 枝孢属 (*Cladosporium* sp.) 占 40.6%、链格孢属 (*Alternaria* sp.) 占 9.4%、曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 占 9.4%、篮状菌属 (*Talaromyces* sp.) 占 9.4%、青霉属 (*Penicillium* sp.) 占 6.3%, 以上 5 种真菌是米粉上主要的优势真菌。同时, 测序获得的序列提交 NCBI 数据库, 并获得序列登录号, 登录号见表 1。研究表明, 谷物作物中常见的真菌污染主要有曲霉属、青霉属、链格孢属和镰刀菌属等真菌^[18]。Sayan 等^[19]对来自亚洲的长粒大

米研究发现, 分离获得的真菌主要是曲霉属真菌 (*Aspergillus* sp.) 和青霉属真菌 (*Penicillium* sp.), 这同本研究结果在真菌种类上具有相似性。

传统真菌鉴定主要通过表型特征进行判断, 菌落培养周期长, 对经验具有一定的要求, 鉴定存在一定的主观性^[20]。基于真菌核糖体 ITS 序列测序鉴定的基因条形码技术被称为真菌鉴定的金标准, 操作周期短, 鉴定准确, 因此被广泛用于真菌的鉴定^[21]。霉菌是干果类制品常见的污染真菌, Gunduz 等^[22]利用 ITS 鉴定发现, 柿饼上抗紫外处理的霉菌主要是米根霉、黑曲霉和藤交霉, 并研究了不同霉菌的耐受剂量。当前对于米粉制品表面霉菌分离鉴定的研究不多, 我们的研究补充了当前研究的不充分, 并为米粉表面霉菌的控制消除提供了理论前提。

2.2 螺蛳粉米粉表面霉菌多样性分析

将测序获得的 ITS 序列导入 MEGA X 软件, 选择 N-J 法构建系统发育树。为更加直观展示米粉上真菌的种属多样性, 在进行系统发育树构建时导入了已知菌种的 ITS 序列, 并对系统发育树中同属的菌株进行了删除, 每个属仅保留 1 株菌种。系统发育树如图 1 所示, 米粉上霉菌经分离鉴定获得 11 个真菌属, 包括青霉属 (*Penicillium* sp.)、曲霉属

(*Aspergillus* sp.)、篮状菌属 (*Talaromyces* sp.)、枝孢属 (*Cladosporium* sp.)、炭团菌属 (*Hypoxylon* sp.)、黑团孢属 (*Periconia* sp.)、链格孢属 (*Alternaria* sp.)、亚格孢壳属 (*Didymella* sp.)、假茎点霉属 (*Nothophoma* sp.)、丝孢酵母属 (*Trichosporon* sp.) 和皮状丝孢酵母属 (*Cutaneotrichosporon* sp.)。在主要的优势菌中, 4027*-1 同 *Penicillium oxalicum* 在同一分支且序列相似度达 99%, 可认定为同种菌株; 4027*-11 同 *Aspergillus flocculosus* 在同一分支且相似度达 100%, 可认定为同种菌株; 4027*-2 同 *Talaromyces landicus* 在同一分支且相似度达 100%, 可认定为同种菌株; 4103-1 同 *Cladosporium tenuissimum* 在同一分支且相似度达 100%, 可认定为同种菌株; 4203-1 同 *Alternaria alternata* 在同一分支且相似度达 100%, 可认定为同种菌株。基于 ITS 序列进行系统发育树的构建是分析种属和亲缘关系常用的手段^[23]。Houbraken 等^[24]通过系统发育分析发现, *Polypaecilum* 和 *Phialosimplex* 属真菌同曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 具有较近的关系, 并将其归于曲霉属 (*Aspergillus* sp.)。结果表明, 分离纯化后的菌株同已知菌株处于系统发育树的同一种分支且序列相似度大部分接近 100%, 分类结果较准确, 可信度较高。

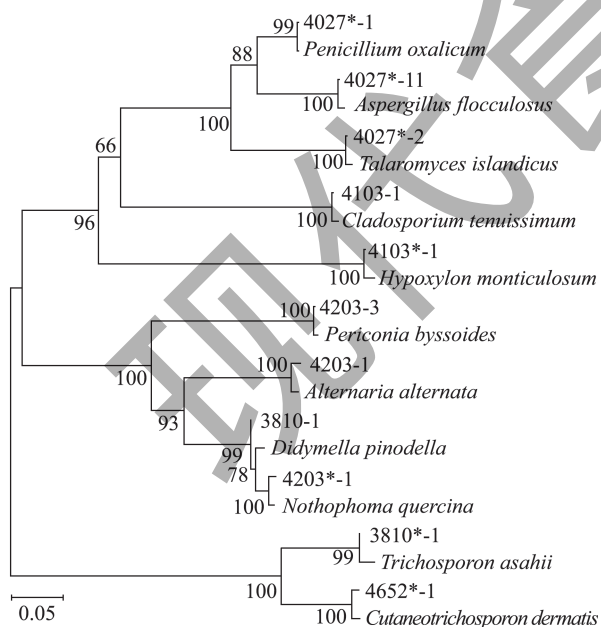


图 1 根据 ITS 序列构建的系统发育树

Fig.1 The phylogenetic tree based on ITS sequence

2.3 螺蛳粉米粉表面霉菌的形态学观察

对螺蛳粉米粉表面分离获得的 5 种优势菌株进行形态学观察结果如图 2 所示。

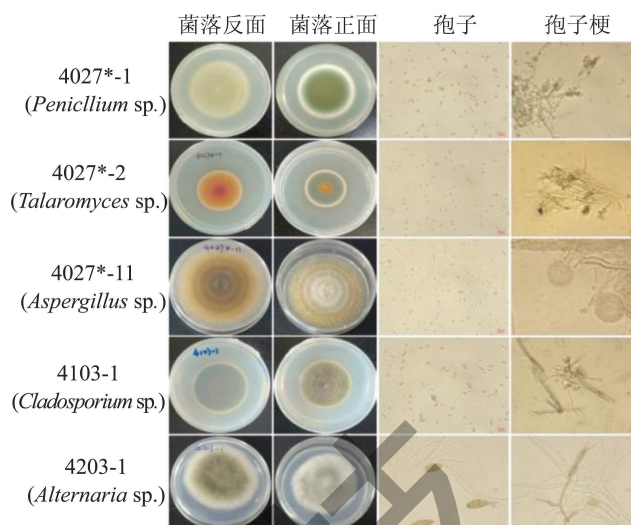


图 2 螺蛳粉米粉表面分离获得的 5 种优势霉菌的形态
Fig.2 The morphology of 5 dominant fungi isolated from rice noodles

4027*-1 (*Penicillium* sp.): 菌落质地为绒毛状, 边缘整齐; 在 PDA 上菌落正面颜色为兰绿色, 外缘为白色; 菌落背面呈现淡绿色轮纹状; 菌落内部中心呈皱褶块状凸起; 显微镜下分生孢子亚球形, 表面光滑, 链柱状排列; 孢子梗白色, 壁光滑; 帚状枝排列疏松, 微叉开, 轮生。

4027*-2 (*Talaromyces* sp.): 菌落呈绒状, 边缘整齐; 在 PDA 上菌落正面呈草绿色, 有橙色孢子附着, 呈轮纹状, 菌落中央有椭圆状凸起, 中间凹陷; 菌落背面中心呈深红色, 颜色向边缘逐渐减淡, 边缘为浅黄色; 分生孢子椭圆形, 橄榄绿色, 大小不一; 分生孢子梗呈无色透明状, 帚状枝不规则, 顶端着生分生孢子。

4027*-11 (*Aspergillus* sp.): 菌落呈绒毛状, 菌丝浓密; 菌落正面可见黄色孢子由外至内产生, 呈轮纹状; 菌落背面中心为棕色, 由内至外颜色变浅, 轮纹状; 显微镜下分生孢子梗顶端膨大成球形泡囊, 泡囊表面以放射状生出小梗; 分生孢子串生于小梗顶端, 作辐射状排列。

4103-1 (*Cladosporium* sp.): 菌落为绒毛状, 表面呈暗绿色, 菌落正面平展, 中央作突点状, 外缘具无色晕圈, 菌落背面呈深绿色; 分生孢子浅橄榄色, 呈纺锤形; 分生孢子梗橄榄褐色, 表面平滑, 不分枝, 产孢部分合轴式延伸。

4203-1 (*Alternaria* sp.): 菌落绒毛状, 生长初期暗白色, 老后变暗; 菌落背面褐色, 呈放射状绒毛状; 菌丝及分生孢子梗具横隔, 分生孢子倒棒状, 表面横隔较粗, 多数为 3 个, 末端喙短。

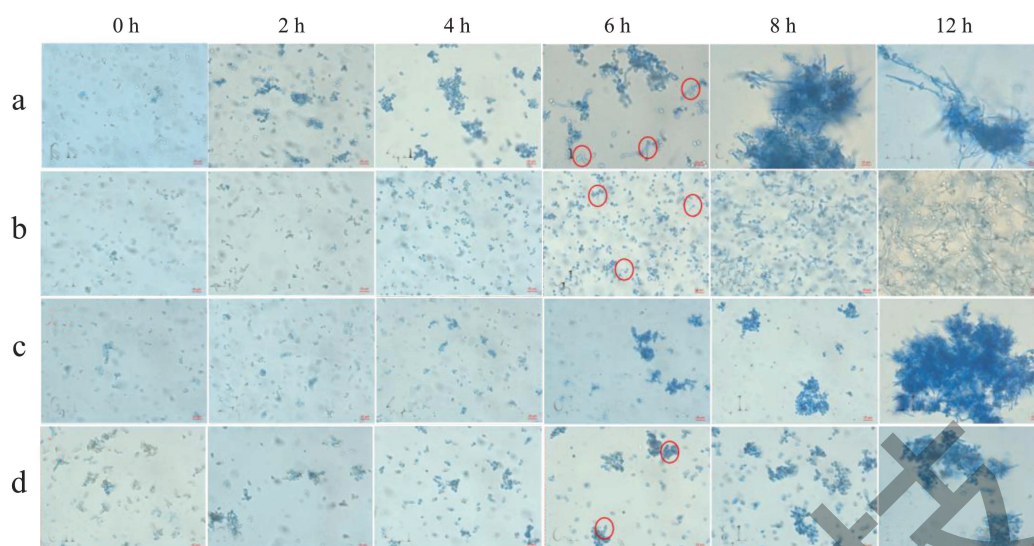


图3 螺蛳粉米粉表面优势真菌的孢子萌发

Fig.3 Germination of the dominant fungi isolated from rice noodles

注: a. 4027*-1 (*Penicillium* sp.) 孢子萌发; b. 4027*-2 (*Talaromyces* sp.) 孢子萌发; c. 4027*-11 (*Aspergillus* sp.) 孢子萌发; d. 4103-1 (*Cladosporium* sp.) 孢子萌发。

5种优势真菌形态学观察结果表明其形态符合所属真菌的典型,并同其他研究者的描述形态相吻合^[25,26]。霉菌污染控制以分离鉴定为基础,开发米粉霉菌污染控制技术如等离子体技术等新型绿色杀菌技术对于提高米粉质量安全水平和螺蛳粉特色产业发展具有重要意义,对杀菌效能和米粉品质影响的探究将是进一步的研究内容和方向。

2.4 螺蛳粉米粉表面霉菌优势菌株孢子萌发

4027*-1 (*Penicillium* sp.) 孢子萌发如图3a所示,4027*-2 (*Talaromyces* sp.) 孢子萌发如图3b所示,4027*-11 (*Aspergillus* sp.) 孢子萌发如图3c所示,4103-1 (*Cladosporium* sp.) 孢子萌发如图3d所示,4203-1 (*Alternaria* sp.) 因孢子较难获取,不作孢子萌发的观察。

由图3可以发现,四种不同属的真菌孢子在萌发前均会出现孢子的吸水膨大,青霉属、篮状菌属真菌孢子在4h时出现膨大,而曲霉属、枝孢属真菌孢子在6h出现膨大,这表明在水分对真菌孢子的正常萌发具有重要的作用。因此,在控制霉菌污染时,保证环境的干燥可作为一种真菌污染的控制手段。从图中红色标记处可以看到,4027*-1 (*Penicillium* sp.)、4027*-2 (*Talaromyces* sp.)、4103-1 (*Cladosporium* sp.) 6h时已经可以观察到孢子的萌发。随着培养时间的增加,孢子芽管继续伸长,孢子萌发率逐渐提高,并聚集呈团状,不易分离。4027*-1 (*Penicillium* sp.) 在培养8h时已经可以观

察到孢子的聚团现象,而其它属的孢子仍处于芽管萌发阶段,这表明4027*-1 (*Penicillium* sp.) 具有更快的生长速率。培养12h时,4027*-1 (*Penicillium* sp.) 和4027*-11 (*Aspergillus* sp.) 出现聚团,孢子萌发接近100%,而4103-1 (*Cladosporium* sp.) 仅观察到少量的萌发。

真菌孢子小而轻,易通过空气和水进行传播,是真菌污染的主要依赖方式^[27]。孢子萌发时前期同向生长膨胀,而后极化生长产生芽管^[28]。Zhou等^[29]对扩展青霉的孢子萌发过程进行监测发现,培养6h后孢子的体积开始变大,培养12h时萌发率接近90%。结果表明不同孢子虽然在萌发时间上有所差异,但初始萌发一般会在12h完成。

2.5 菌丝蔓延观察

螺蛳粉米粉表面5种优势霉菌菌丝蔓延情况如图4a所示,菌落直径如图4b所示。由4a可以观察到,当培养7d时,4027*-1 (*Penicillium* sp.)、4027*-11 (*Aspergillus* sp.) 和4203-1 (*Alternaria* sp.) 菌落已经占据了大部分的培养皿,其菌落直径分别为51.58、65.5、83.33 mm,而4027*-2 (*Talaromyces* sp.) 和4103-1 (*Cladosporium* sp.) 菌落依旧较小,其菌落直径分别为26.25 mm、25.16 mm,这表明前者具有更高的平均生长速率(图4a)。通过菌落直径数据可以看到,4027*-2 (*Talaromyces* sp.) 和4103-1 (*Cladosporium* sp.) 整体上处于比较低的生长速率,而4203-1 (*Alternaria* sp.) 在整个生长过程中均具有

最大的菌落直径和最高的阶段生长速率；4027*-1 (*Penicillium* sp.) 虽然在前期具有生长优势，但后期生长要弱于 4027*-11 (*Aspergillus* sp.) (图 4b)。此外，4027*-2 (*Talaromyces* sp.) 和 4103-1 (*Cladosporium* sp.) 虽然生长最慢，但具有更深的菌落颜色，这可能与产孢子的水平较高有关；4027*-1 (*Penicillium* sp.) 不仅具有较高的生长速率，且在生长前期就已经有孢子的产生；反观 4027*-11 (*Aspergillus* sp.) 和 4203-1 (*Alternaria* sp.) 虽然生长较快，但是生长前期产孢较少。真菌以菌丝的形式进行生长，当菌丝生长到一定阶段时，菌丝形成一个水平的隔膜或扩大形成孢子^[30]。孢子的产生虽然同菌丝的生长存在一定的关系，但结果表明，链格孢菌虽然菌丝生长较快，但是孢子产生时间较慢，而青霉菌不仅菌丝生长速度较快，且在生长前期就已经可以观察到孢子的产生。当前对于米粉上污染的真菌是否具有产毒能力尚未见报道，这对米粉行业来说可能是巨大的安全风险隐患，因此，对其污染真菌是否具有产毒能力的揭示将对米粉质量安全有进一步的了解。

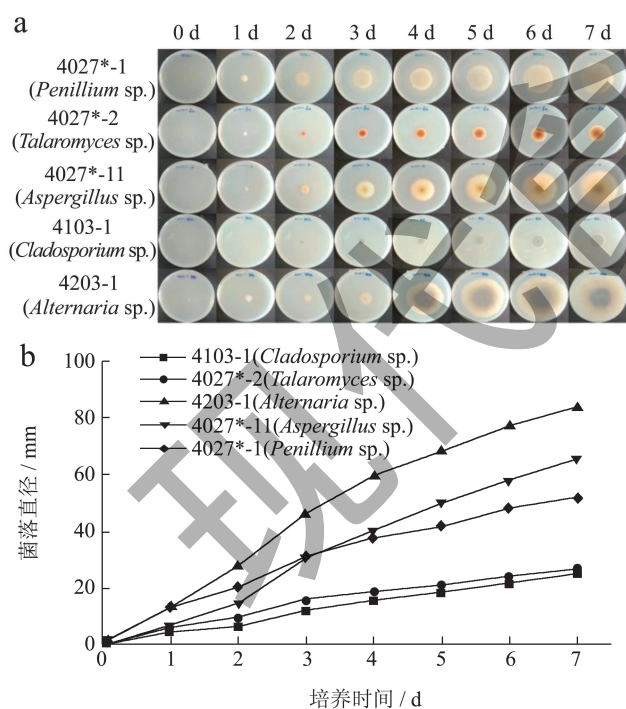


图 4 米粉表面优势真菌的菌丝生长

Fig.4 The mycelium expansion of 5 dominant fungi isolated from rice noodles

注：(a) 菌丝生长；(b) 菌落直径。

3 结论

螺蛳粉米粉霉菌污染是造成米粉质量安全问题

的重要因素，霉菌种类的分离鉴定是开发霉菌控制消除技术的前提，但螺蛳粉米粉上霉菌的分离鉴定鲜有报道。本研究通过对不同批次的螺蛳粉预包装米粉表面的霉菌污染物进行分离鉴定，共分离获得 32 个菌种样本，经系统发育树分析可以分为 11 个属，其中青霉属 (*Penicillium* sp.)、枝孢属 (*Cladosporium* sp.)、链格孢属 (*Alternaria* sp.)、曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 和篮状菌属 (*Talaromyces* sp.) 是米粉表面主要的优势真菌。对优势真菌生长特性研究发现，青霉属 (*Penicillium* sp.)、枝孢属 (*Cladosporium* sp.) 和篮状菌属 (*Talaromyces* sp.) 孢子萌发时间要早于曲霉属 (*Aspergillus* sp.)。曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 和链格孢属 (*Alternaria* sp.) 虽然菌丝蔓延较快，但产孢较慢；而青霉属 (*Penicillium* sp.) 不仅生长速度快，而且生长的同时也伴随着孢子的大量产生。综合考虑菌株的生长和孢子产生对米粉造成的污染，可以将青霉属 (*Penicillium* sp.) 真菌作为重点关注对象。本研究是首次对螺蛳粉米粉上霉菌进行分离鉴定的报道，可为螺蛳粉米粉霉菌污染物的防控处理提供借鉴和参考。

参考文献

- [1] MA L, ZHANG M, BHANDARI B, et al. Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables [J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 64: 23-38.
- [2] GAVAHIAN M, CULLEN P J. Cold plasma as an emerging technique for mycotoxin-free food: efficacy, mechanisms, and trends [J]. Food Reviews International, 2019, 36: 193-214.
- [3] MAHATO D K, KAMLE M, SHARMA B, et al. Patulin in food: A mycotoxin concern for human health and its management strategies [J]. Toxicon, 2021, 198: 12-23.
- [4] UCAR Y, CEYLAN Z, DURMUS M, et al. Application of cold plasma technology in the food industry and its combination with other emerging technologies [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 114: 355-371.
- [5] JOGEE P S, INGLE A P, RAI M. Isolation and identification of toxigenic fungi from infected peanuts and efficacy of silver nanoparticles against them [J]. Food Control, 2017, 71: 143-151.
- [6] BANJARA N, SUHR M J, HALLEN H E. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types [J]. Current Microbiology, 2015, 70: 792-800.
- [7] CELESTIN M, LLOYD B B. Molds and mycotoxins in

- foods from Burundi [J]. Journal of Food Protection, 1996, 59(8): 869-875.
- [8] 童军茂,马伟荣,王坚,等.哈密瓜采后冷藏中主要病原菌的分离鉴定[J].现代食品科学,2013,29(8):2030-2034.
- [9] 陈奕君,陈荣珍,覃俊达.柳州螺蛳粉生产中的关键危害分析与控制研究[J].柳州职业技术学院学报,2022,22(4): 151-155.
- [10] 覃冬杰,吴婧,许蓉蓉,等.柳州螺蛳粉原料螺蛳中五种重金属元素的测定及安全性评价[J].食品与发酵工业, 2022,48(8):276-280.
- [11] 谢云峰,陈瑶,陈丽燕,等.青天葵提取液清除螺蛳粉中亚硝酸盐的研究[J].现代食品,2022,28(23):94-98.
- [12] 冯丹丹,韦尉宁,滕建文,等.柳州螺蛳粉原料酸笋加工技术及其风味物质研究进展[J].现代食品,2022,28(15):8-11.
- [13] GARDES M, BRUNS T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts [J]. Molecular Ecology, 1993, 2 (2): 113-118.
- [14] ZHAO W F, LI Z, HUANG X F, et al. The complete mitochondrial genome of *Salmacis sphaeroides* variegata (Mortensen, 1942) [J]. Mitochondrial DNA Part B, 2019, 4(2): 3829-3830.
- [15] TIAN J, BAN X Q, ZENG H, et al. The Mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus* [J]. PloS One, 2012, 7(1): e30147.
- [16] SAMSON R A, VISAGIE C M, HOUBRAKEN J J, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus* [J]. Studies in Mycology, 2014, 78 (4): 141-173
- [17] LI B Q, LAI T F, QIN G Z, et al. Ambient pH stress inhibits spore germination of *Penicillium expansum* by impairing protein synthesis and folding: A proteomic-based study [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9 (1): 298-307
- [18] LUCIA C C, Virginia F P, ANDREA P. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166: 1-14.
- [19] SAYAN R, JOHN C, KOFI A. Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland-Science Direct [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 55(1): 653-658
- [20] LU Z H, PENG H H, CAO W, et al. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria and yeasts from sour *Mifen*, a traditional fermented rice noodle from China [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(3): 893-903.
- [21] DAS S, DEB B. DNA barcoding of fungi using Ribosomal ITS Marker for genetic diversity analysis: A Review [J]. International Journal of Pure & Applied Bioscience, 2015, 3 (3): 160-167
- [22] GUNDUZ G T, KORKMAZ A. UV-C treatment for the inhibition of molds isolated from dried persimmons (*Diospyros kaki* L.) and modelling of UV-C inactivation kinetics [J]. LWT-Food Science & Technology, 2019, 115: 108451.
- [23] SCHOCH C L, SEIFERT K A, HUHDORF S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 109: 6241-6246.
- [24] HOUBRAKEN J, SAMSON R A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families [J]. Studies in Mycology, 2011, 70:1-51.
- [25] 单夏男,徐可心,阮永明,等.篮状菌属的四个中国新记录种[J].菌物学报,2021,40(5):1216-1231.
- [26] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社, 1979.
- [27] LATGE J P, BEAUVAIS A. Functional duality of the cell wall [J]. Current Opinion in Microbiology, 2014, 20: 111-117.
- [28] DAGUE E, ALSTEENS D, LATGE J P, et al. High-resolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia [J]. Biophysical Journal, 2008, 94 (2): 656-660.
- [29] ZHOU T, WANG X H, LUO J, et al. Identification of differentially expressed genes involved in spore germination of *Penicillium expansum* by comparative transcriptome and proteome approaches [J]. Microbiology Open, 2018, 7(3): e00562.
- [30] JYOTHIKUMAR V, TILLEY E J, WALI R, et al. Time-lapse microscopy of *Streptomyces coelicolor* growth and sporulation[J]. Applied Environmental Microbiology. 2008, 74 (21): 6774-6781.