

• 综 述 •

中药材污染曲霉属真菌鉴定研究进展

郭梦月, 庞晓慧*

中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 国家中医药管理局中药资源保护重点研究室, 北京 100193

摘 要: 近年来, 药材污染真菌毒素事件时有发生, 引起国内外广泛关注。真菌毒素能引发肝毒性、肾毒性等重大毒性反应, 严重威胁了消费者生命健康。曲霉属真菌是污染中药材的主要优势菌群之一, 对中药材污染曲霉属真菌进行快速准确鉴定可对中药材真菌毒素污染进行早期风险预警, 这对保障中药材的有效性和安全性具有重要意义。对曲霉属真菌的分类、鉴定以及中药材污染曲霉属真菌鉴定研究进行系统综述, 同时对利用高通量测序技术鉴定中药材污染真菌的前景进行了展望。

关键词: 中药材; 曲霉属; 真菌; 真菌毒素; 真菌鉴定

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)16-3933-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.030

Research progress on identification of *Aspergillus* fungi in traditional Chinese medicinal materials

GUO Meng-yue, PANG Xiao-hui

Key Laboratory of Chinese Medicine Resources Conservation, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: The issues of mycotoxin contamination in herbal materials have been frequently reported in recent years, which has attracted broad attention at home and abroad. Mycotoxins can trigger hepatotoxicity, nephrotoxicity, and other significant toxic effects, threatening the consumer health seriously. *Aspergillus* species are one of the main sources of fungal contamination in herbal materials. The rapid and accurate identification of *Aspergillus* species in herbal materials can provide early warning of mycotoxin contamination, which is of great significance for ensuring the efficacy and safety of herbal materials. In this study, the research progress on the classification and discrimination of *Aspergillus* species were systematically summarized. Moreover, the identification of *Aspergillus* species in herbal materials was also reviewed. Meanwhile, we explored the prospect of identifying *Aspergillus* species in Chinese herbal medicines using high-throughput sequencing.

Key words: traditional Chinese medicinal materials; *Aspergillus*; fungi; fungaltxin; fungi identification

中药材尤其是富含油脂和糖类等高营养成分的药材, 在种植、采收、加工、运输及储藏过程中, 由于受到其自身内在因素如有机物、含水量等和外在环境条件如光照、湿度、温度等的影响而污染细菌和真菌等微生物, 进而易发生霉变并产生真菌毒素^[1]。真菌毒素能引起肝毒性、肾毒性、致癌等重大毒性反应^[2-3]。中药材污染真菌和真菌毒素后, 不仅会

对药材质量造成影响, 而且对中药及其产品的安全性和有效性造成影响, 直接威胁到消费者的生命健康。此外, 还会因为药材霉变无法使用造成巨大经济损失^[4-5]。目前, 中药材中时有真菌和真菌毒素污染的情况发生, 其中曲霉属真菌为药材的主要污染菌之一。对药材中曲霉属真菌进行快速、准确地鉴定可对药材污染真菌毒素进行早期风险预警, 对保障中药材

收稿日期: 2018-04-13

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2017-I2M-1-013)

作者简介: 郭梦月 (1994—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药污染真菌分子鉴定。E-mail: guomy0908@126.com

*通信作者 庞晓慧, 副研究员, 主要从事中药分子鉴定与中药污染真菌鉴定研究。E-mail: xhpang@implad.ac.cn

有效性和安全性具有重要意义。本文对曲霉属真菌的分类、鉴定以及药材污染曲霉属真菌鉴定研究进展进行了系统的综述,同时对利用高通量测序技术鉴定中药材污染真菌的前景进行了展望。

1 曲霉属真菌的分类

曲霉属由 Micheli 于 1729 年提出^[6], Haller 在 1768 年进行了验证^[7], Fries 于 1832 年正式确认了曲霉属的通用名称 *Aspergillus*^[8]。传统上曲霉属的分类基于其形态特征, Raper 和 Fennell 于 1965 年把这个属划分为 18 个组^[9]。Gams 等^[10]根据微观形态特征如分生孢子头的形状、颜色, 顶囊的形状以及产孢细胞的排列方式等, 将曲霉属真菌分为 6 个亚属: 曲霉亚属 subgen. *Aspergillus*、烟色亚属 subgen. *Fumigati*、棒状亚属 subgen. *Clavati*、巢状亚属 subgen. *Nidulantes*、环绕亚属 subgen. *Circumdati* 以及华丽亚属 subgen. *Ornati*。随着“一种真菌, 一个名称”概念的提出, 现代的曲霉分类系统也发生了很大变化, 曲霉的有性型属全部被处理为曲霉属的异名。根据分子系统学的聚类结果, Houbraken 等^[11]提出将曲霉属分为 4 个亚属和 19 个组。原先的棒状亚属被合并到烟色亚属, 华丽亚属被移出曲霉属。Samson 等^[12]详述了曲霉属真菌的分类、系统发育以及命名法, 描述了已知的 339 种曲霉属真菌及需要移出和存疑的物种。Visagie 等^[13]修订了曲霉属 *Circumdati* 组的物种, 该组共有 27 个物种, 引入了 7 种新物种: *A. occultus*、*A. pallidofulvus*、*A. pulvericola*、*A. salwaensis*、*A. sesamicola*、*A. subramanianii* 和 *A. westlandensis*。Hubka 等^[14]对曲霉属 *Flavipedes* 组的分类进行了修订, 包括 3 个已知种和 7 个新的物种: *A. ardalensis*、*A. frels*、*A. luppii*、*A. magaliensis*、*A. movilensis*、*A. polyporicola* 和 *A. spelaeus*。Chen 等^[15]综合分子系统学、形态学等分析, 对巢状亚属 *Nidulantes* 进行了系统整理, 提出 1 个新组 *Cavernicolus*, 报道了 10 个新种, 目前巢状亚属共有 9 个组 117 个物种。此外, Chen 等^[16]也对曲霉属 *Aspergillus* 组的分类问题进行了研究, 共归属 31 个物种, 其中 9 个是新物种。Kocsubé 等^[17]通过使用多位点系统发育方法建立了 2 个独立的系统发育分析来检验曲霉属的单系性, 统计分析结果推翻了曲霉属是非单系的假说, 提供了强有力的论点支持该属是单系的, 与单系青霉属明显区分开。

2 曲霉属真菌的鉴定方法

2.1 形态鉴定

传统的形态学鉴定一般以菌落的宏观形态特征和显微特征为鉴定依据^[18], 显微镜和菌株培养仍然是用于鉴定曲霉属真菌的常用和基本工具。Diba 等^[19]使用 4 种不同的培养基培养 52 株和 153 株分别从临床和环境标本中分离出来的曲霉菌株, 并对上述培养基上菌落的形态特征及主要菌株的显微特征进行了研究, 与标准曲霉菌株进行了比较。在所鉴定的 11 种曲霉菌中, 黄曲霉 *A. flavus* (55%)、黑曲霉 *A. niger* (31.7%) 和烟曲霉 *A. fumigatus* (8.7%) 是所有标本中最常见的曲霉属分离株。Nyongesa 等^[20]从宏观和微观形态特征鉴别了从玉米田中分离出来的曲霉属菌种, 根据形态学特征鉴定了曲霉属 7 个组 *Flavi*、*Fumigati*、*Nigri*、*Circumdati*、*Clavati*、*Nidulantes* 和 *Candidi*, 其中 *Flavi* 占主导地位 (57%), 其次是 *Nigri* (27%)。Chen 等^[15]对已知的巢状亚属的真菌形态特征进行了详细描述, 包括子囊孢子的颜色、形状、大小和纹饰、分生孢子和囊泡的形状及大小、生长温度等, 为曲霉属巢状亚属真菌的形态鉴定提供了重要的参考依据。

2.2 分子鉴定

分子鉴定是指通过直接分析遗传物质 DNA 的多态性来推断物种内在的遗传变异而实现物种鉴定的方法^[21]。分子鉴定不受物种形态限制和环境影响, 直接从基因水平进行鉴定, 目前已发展成为主流鉴定方法之一。

PCR 技术是分子鉴定中常用技术之一, 其基本原理为根据已知保守核苷酸序列设计引物, 对目的序列进行特异性扩增, 利用凝胶电泳对扩增产物进行分析, 判断样品中是否含有检测的目标物种。PCR 呈指数扩增, 能在短时间内扩增出大量目的片段, 省时省力、操作简便、灵敏度较高, 在真菌检测中也是常用的方法之一。基于 PCR 技术的多种分子鉴定技术已用于曲霉属真菌的检测和鉴定, 如实时 PCR (RT-PCR)、扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphisms, AFLP) 技术、PCR-RFLP、巢式 PCR、重复序列 PCR (rep-PCR) 和聚合酶链式反应-单链构象多态性 (PCR-SSCP) 等方法^[22-31]。Susca 等^[24]采用 PCR-SSCP 方法来检测钙调蛋白基因约 180 bp 区域中包含的序列变异, 该方法可快速鉴别曲霉属 *Nigri* 组物种。Kanbe 等^[26]

针对烟曲霉、黑曲霉、黄曲霉、构巢曲霉 *A. nidulans* 和土曲霉 *A. terreus* 几个物种,设计并测试了 DNA 拓扑异构酶 II 基因组序列的物种特异性引物,发现使用这些特异性引物可以区分混合 DNA 模板中的曲霉属物种。同样,Palumbo 等^[28]基于钙调蛋白基因序列中的物种保守性差异,开发了 4 种特异性 PCR 引物来区分黑曲霉、*A. welwitschiae*、*A. carbonarius* 和塔宾曲霉 *A. tubingensis*。该方法也可能适用于在不分离菌株的情况下,确定环境样品中曲霉菌物种的分布。

DNA 条形码是近年来国际上发展快速的物种鉴定新技术。该技术利用基因组中一段相对较短的、标准的 DNA 序列进行物种鉴定^[32],自动学家 Paul Hebert 提出后迅速成为研究热点, cytochrome c oxidase I (COI) 序列被建议作为动物鉴定的通用条形码。目前, DNA 条形码技术也应用于曲霉属真菌的鉴定中。Geiser 等^[33]发现用于鉴定动物的 COI 序列在鉴定曲霉属的黑曲霉时具有局限性,提出 BenA 或 CaM 是鉴定曲霉属物种的最有前景的条形码序列。基于大量数据分析, Schoch 等^[34]提出将 ITS 作为真菌的通用条形码。Samson 等^[12]的研究涵盖了 339 种曲霉属真菌所有模式种的 ITS、CaM、BenA 和 RPB2 序列信息,建议将 CaM 作为 ITS 的辅助序列来鉴定曲霉属物种。Chen 等^[16]利用 ITS、BenA、RPB2 和 CaM 4 种条形码对曲霉属 *Aspergillus* 组的物种进行鉴定,结果发现 ITS 序列在种间高度保守而不能有效鉴定该组物种, CaM 和 RPB2 序列均可区分所有物种, BenA 序列可区分该组除 *A. brunneus* 和 *A. niveoglaucus* 之外的所有物种。

2.3 其他鉴定方法

基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 是近年来兴起的微生物快速鉴定分析技术。该方法具有操作简便、迅速、准确率高和成本低的特点^[35],研究者利用其来对曲霉属真菌进行鉴定^[36-38]。Verwer 等^[37]发现基于 MALDI-TOF-MS 可以准确鉴定形态相似的 *A. lentulus* 和烟曲霉。De Respinis 等^[38]评估了 MALDI-TOF-MS 方法对一些临床和环境中的重要 *Flavi* 组和 *Fumigati* 组曲霉进行鉴定的可能性,并将结果与形态学及测序结果进行比较分析,表明在分离曲霉的隐形种时, MALDI-TOF-MS 优于测序方法。

此外,傅里叶变换红外光谱 (fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR) 技术也是曲霉属真菌分类鉴定研究的有效工具。Garon 等^[39]利用 FT-IR 快速鉴定从农业区收集的 99 株分离菌株,结果表明可以准确鉴定黄曲霉、烟曲霉和寄生曲霉 *A. parasiticus* 这 3 种真菌。Tralamazza 等^[40]利用 FT-IR 鉴定了从咖啡豆中分离出来的 3 种环境曲霉菌种黑曲霉、赭曲霉 *A. ochraceus* 和 *A. westerdijkiae* 的可能性,认为该技术对鉴定分离菌株具有广阔的应用前景。

2.4 小结

目前,形态鉴定和分子鉴定方法在曲霉属真菌鉴定中应用较为广泛。其中,传统的形态鉴定以菌落的形态和显微特征为鉴定依据,需要专业的微生物鉴定知识,对鉴定者要求较高。分子鉴定方法基于 DNA 鉴定物种,通用性强,易形成统一鉴定标准,还可基于大量数据构建物种标准序列数据库。此外, MALDI-TOF MS 和 FT-IR 技术均具有易操作、快速、高效等特点,但多针对特定的曲霉属物种进行鉴定,在通用性上存在一定缺陷。

3 药材污染曲霉属真菌的鉴定研究

真菌能作用于药材中的物质,生成自身细胞所需成分及分泌代谢物,使药材药效物质含量发生变化^[4]。研究表明,相比于霉变前,吴茱萸、当归等药材在霉变后药材中药效物质含量均降低^[41-42]。真菌污染中药材不仅会产生真菌毒素等外源性毒性物质,同时也会中药材自身的内源性毒性物质含量造成影响。曹艺等^[43]研究发现,米曲霉能使马兜铃、关木通和寻骨风 3 种中药材中马兜铃酸 A 含量不同程度地增加。真菌污染药材后会中药材的药效物质和安全性产生影响,被真菌污染的药材在市场上流通对消费者的安全造成潜在的威胁,药材污染真菌的检测和鉴定对保障中药材安全性具有重要意义。

国内已有关于中药材霉变染菌的报道,这对消费者身体健康和生命安全带来了潜在的风险和威胁。陈娟等^[44]对 7 种受赭曲霉毒素 A 污染的根类药材进行污染真菌的分析,在甘草和黄芩中分别分离到寄生曲霉 *A. parasiticus* 和黑曲霉。此外,在江西、浙江、河南和北京药店售卖的甘草药材中也分别检测到曲霉属真菌^[45]。研究者还对 12 种药用种子类药材表面的真菌进行了鉴定,结果表明曲霉属真菌是最常见的真菌,黑曲霉占据比例最大 (12%),其次是杂色曲霉 *A. versicolor* (7%)、塔

宾曲霉 (7%) 和烟曲霉 (5%)^[46]。秦筱茂^[47]检测了白芍、铁皮石斛、大青叶等 9 种中药的个子和饮片药材中真菌及真菌毒素污染情况, 发现曲霉属菌占分离总菌株数的 24.1%, 为优势菌群之一; 饮片药材的优势菌为曲霉属和青霉属真菌。宋美芳等^[48]收集了来源于云南不同地区市售的三七、草果药材, 以形态学特征为依据并结合分子生物学方法对药材表面的主要分离菌株进行鉴定, 结果表明 2 种药材均受到曲霉属真菌污染。王文丽等^[49]根据真菌基因组 ITS 序列设计了特异引物, 对 15 种湖北省售中药材中分离得到 50 株真菌进行鉴定, 成功鉴定其中的 27 株, 以曲霉属真菌的污染较严重。随后, Zheng 等^[50]对湖北、湖南和广西产的 15 种

中药材中真菌进行了形态鉴定和分子鉴定, 成功鉴定了 126 种真菌, 其中曲霉属和青霉属真菌占主导地位。王福^[51]对 8 批陈皮中的真菌进行了分离鉴定, 共分离得到 25 株菌株, 通过显微鉴定和分子生物学鉴定, 发现陈皮中优势菌株为黑曲霉。苏春燕等^[52]分析了三七、柴胡和党参 3 种根类药材的真菌污染情况, 发现 3 种药材中均有曲霉属真菌的污染。Kong 等^[53]对市场上 14 种功能性食品和 10 种香料真菌污染情况进行了调查, 结果发现曲霉属和青霉属是污染的优势菌群, 功能性食品中薏苡仁受污染最严重, 香料中小茴香和花椒受污染最严重。目前国内已报道的受曲霉属真菌污染中药材及污染真菌种类见表 1。

表 1 国内中药材曲霉属真菌污染情况

Table 1 Contamination status of *Aspergillus* fungi in traditional Chinese medicinal materials in China

类型	名称	药材拉丁名	来源	真菌种类	参考文献	
根及根茎类	甘草	<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	江西	寄生曲霉	44-45	
			浙江	杂色曲霉、聚多曲霉 <i>A. sydowii</i>	45	
			河南	黄曲霉、杂色曲霉	45	
			北京	黄曲霉、聚多曲霉	45	
			湖北、湖南、广西	寄生曲霉、刺孢曲霉 <i>A. aculeatus</i>	49-50	
			安徽	<i>Aspergillus</i> spp.	47	
			安徽	<i>Aspergillus</i> spp.	47	
			江西	黑曲霉	44	
			云南	烟曲霉	48	
			湖北、湖南、广西	杂色曲霉	49-50	
	河北	<i>Aspergillus</i> spp.	52			
	当归	<i>Angelicae Sinensis Radix</i>	湖北、湖南、广西	刺孢曲霉、烟曲霉	49-50	
	黄芪	<i>Astragali Radix</i>	湖北、湖南、广西	烟曲霉	49-50	
	党参	<i>Codonopsis Radix</i>	湖北、湖南、广西	刺孢曲霉	49-50	
			湖北	<i>Aspergillus</i> spp.	52	
	柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	河北	<i>Aspergillus</i> spp.	52	
	太子参	<i>Pseudostellariae Radix</i>	湖北、湖南、广西	杂色曲霉	49-50	
	姜	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	四川、广东	黑曲霉	53	
	果实及种子类	橘核	<i>Citri Reticulatae Semen</i>	广东	黄曲霉	46
		荔枝核	<i>Litchi Semen</i>	广西	赭曲霉、烟曲霉	46
决明子		<i>Cassiae Semen</i>	河北	杂色曲霉、烟曲霉	46	
菟丝子		<i>Cuscutae Semen</i>	内蒙古	黑曲霉、构巢曲霉	46	
薏苡仁		<i>Coicis Semen</i>	贵州	亮白曲霉 <i>A. candidus</i> 、烟曲霉	46	
			北京	黑曲霉、黄曲霉、赭曲霉	53	
沙苑子		<i>Astragali Complanati Semen</i>	甘肃	聚多曲霉、塔宾曲霉、黑曲霉、黄曲霉	46	
莲子		<i>Nelumbinis Semen</i>	山东	塔宾曲霉、赭曲霉、杂色曲霉、聚多曲霉	46	
			北京	黑曲霉、黄曲霉、赭曲霉	53	
桃仁		<i>Persicae Semen</i>	山东	黑曲霉、烟曲霉、黄曲霉、构巢曲霉	46	
	葶苈子	<i>Descurainiae Semen Lepidii Semen</i>	河北	聚多曲霉、构巢曲霉、杂色曲霉	46	

续表 1

类型	名称	药材拉丁名	来源	真菌种类	参考文献
果实及种子类	车前子	<i>Plantaginis Semen</i>	辽宁	烟曲霉、黑曲霉、杂色曲霉	46
	柏子仁	<i>Platycladi Semen</i>	山东	黑曲霉、黄曲霉	46
	草果	<i>Tsaoko Fructus</i>	云南	烟曲霉、黄曲霉	48
	苦杏仁	<i>Armeniacae Semen Amarum</i>	湖北、湖南、广西	杂色曲霉	49-50
			河北	黑曲霉、黄曲霉	53
	枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	湖北、湖南、广西	黄曲霉、杂色曲霉	49-50
			宁夏	黄曲霉	53
			北京	黑曲霉	53
	山楂	<i>Crataegi Fructus</i>	北京	黑曲霉	53
	白果	<i>Ginkgo Semen</i>	北京	黑曲霉	53
	小茴香	<i>Foeniculi Fructus</i>	河北	黑曲霉、黄曲霉	53
	花椒	<i>Zanthoxyli Pericarpium</i>	北京	黑曲霉、黄曲霉	53
	陈皮	<i>Citri Reticulatae Pericarpium</i>	四川、广东	黑曲霉、黄曲霉	51
全草类	薄荷	<i>Menthae Haplocalycis Herba</i>	安徽	<i>Aspergillus</i> spp.	47
	车前草	<i>Plantaginis Herba</i>	安徽	<i>Aspergillus</i> spp.	47
	蒲公英	<i>Taraxaci Herba</i>	安徽	<i>Aspergillus</i> spp.	47
	穿心莲	<i>Andrographis Herba</i>	湖北、湖南、广西	杂色曲霉、烟曲霉	49-50
花类	红花	<i>Carthami Flos</i>	湖北、湖南、广西	黄曲霉	49-50
叶类	大青叶	<i>Isatidis Folium</i>	安徽	<i>Aspergillus</i> spp.	47
皮类	肉桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	北京	黑曲霉、黄曲霉	53

药材真菌和真菌毒素污染问题除在国内引起广泛关注外,在国外也有报道。Rizzo 等^[54]对阿根廷的 56 种草药(152 个样本)中的有毒真菌进行了检测,发现 52% 的样本被曲霉属真菌污染,其中 27% 属于 *Flavi* 组,25% 属于 *Circumdati* 组,黄曲霉 *A. flavus* 和寄生曲霉 *A. parasiticus* 是分离出来的主要污染菌。Bugno 等^[55]对 91 份产自巴西的草药样品进行真菌污染评估,结果表明 89.9% 的分离菌株属于曲霉属和青霉属,其中有 21.97% 的曲霉和青霉菌能够产生黄曲霉毒素(42.9%)、赭曲霉毒素 A(22.4%)和桔霉素(34.7%)。Katerere 等^[56]收集了 16 份南非市场上销售的商品药材,并对这些药材的真菌和真菌毒素污染情况进行了分析,结果发现 16 个样品中有 15 个受到各种真菌的污染,其中黑曲霉是最常见的污染菌。Gautam 等^[57]在印度瓜廖尔市市场上收集了 3 种药用干燥果实(106 份样品),研究发现 97.77% 的样品含有不同的真菌,在所获得的主要霉菌中曲霉属(71.95%)是优势菌群,其次是青霉属(15.44%)。Rajeshwari 等^[58]对印度市场上常用的 6 种药材进行真菌污染分析后发现,曲霉属和青霉属是优势菌群,其中黑曲霉是最常见的真菌,其次是黄曲霉。在沙特阿拉伯产的 50 份肉桂样品中所分离得到的菌株中,黄曲霉和棒曲霉 *A. clavatus* 的发生率最高,其次是烟曲霉、黑曲霉、灰绿曲霉

A. glaucus 和土曲霉,检出率分别为 16.9%、13.2%、3.3%和 1.2%^[59]。在伊拉克市场上销售的 16 份香料和药用植物中也频繁检测到曲霉属和青霉属真菌^[60]。在巴基斯坦药材市场收集的 30 份药用植物中,90% 的样本存在真菌污染,主要霉菌是黄曲霉、黑曲霉 *A.* 寄生曲霉 *A. parasiticus* 和青霉菌,其中 47 个分离菌株中有 31% 是产毒菌^[61]。国外已报道药材曲霉属真菌污染情况见表 2。

综上所述,国内外药材真菌污染现象的存在,容易造成用药安全隐患。多种常用药材中均检测到真菌污染,其中曲霉属真菌是药材污染的优势菌群之一。目前,药材中曲霉属真菌鉴定方法多以分离培养为主,基于分离得到的菌株再辅以分子鉴定等方法,综合多种分析方法的鉴定结果最终获得药材污染曲霉属真菌的情况。

4 结语与展望

中药材在种植、采收、运输和贮藏等多个环节容易受到自身内在因素和外界环境条件的影响而发生霉变,曲霉属产毒真菌污染中药材的事件也被报道。中药材被产毒真菌污染后,在适宜条件下真菌将会大量繁殖并且产生真菌毒素,而真菌毒素产生后很难消除^[62]。黄曲霉毒素和赭曲毒素等具有致癌、致畸等毒害作用,中药材尤其是中药饮片与消费者生命安全直接相关,受到真菌毒素污染的中药

表 2 国外药材曲霉属真菌污染情况

Table 2 Contamination status of *Aspergillus* fungi in traditional Chinese medicinal materials in foreign countries

来源	药材数量/种	真菌种类	参考文献
阿根廷	34	黄曲霉、赭曲霉、寄生曲霉、酱油曲霉 <i>A. sojae</i> 、硫色曲霉 <i>A. sulphureus</i> 、 <i>A. sclerotiorum</i> 、 <i>A. alliaceus</i>	54
巴西	65	黄曲霉、赭曲霉、黑曲霉、寄生曲霉、烟曲霉	55
南非	9	黑曲霉	56
印度	3	黄曲霉、赭曲霉、黑曲霉、烟曲霉、土曲霉、杂色曲霉、 <i>A. nidulens</i> 、 <i>A. luchensis</i> 、 <i>A. anstelodani</i>	57
印度	6	黄曲霉、赭曲霉、黑曲霉、烟曲霉、土曲霉、刺孢曲霉、杂色曲霉、亮白曲霉、寄生曲霉、溜曲霉 <i>A. tamarii</i> 、棒曲霉 <i>A. clavatus</i> 、焦曲霉 <i>A. ustus</i> 、 <i>A. flavipes</i> 、 <i>A. lucknowensis</i> 、 <i>A. radicinum</i> 、 <i>A. nidulens</i> 、 <i>A. luchuensis</i>	58
沙特阿拉伯	1	黄曲霉、黑曲霉、烟曲霉、土曲霉、棒曲霉、灰绿曲霉 <i>A. glaucus</i>	59
伊拉克	14	黄曲霉、黑曲霉、刺孢曲霉、土曲霉、溜曲霉、 <i>A. ochraceous</i>	60
巴基斯坦	10	黄曲霉、黑曲霉、寄生曲霉、土曲霉	61

材对人类健康造成严重威胁。曲霉属真菌是重要的药材污染菌，对其进行快速、准确检测与鉴定尤为重要。目前鉴定曲霉属真菌最常用的方法为形态鉴定和分子鉴定。除此以外，微生物的多相分类学鉴定方法从多个层面对微生物进行分类鉴定，综合分析微生物的表型、基因型和化学分类学等特征，可以科学分析微生物分类地位^[63]，提高了鉴定结果的准确性，也被广泛应用于曲霉属真菌的鉴定中^[64-66]。

近年来，高通量测序技术迅速发展，测序通量不断提高，成本不断下降，时间逐渐缩短，是目前应用最普遍的测序技术之一。该技术对分析微生物群落结构有独特的优势，能够通过从环境样本中直接获取的总 DNA 进行文库构建并测序，更好地反映环境中微生物群落的复杂性和多样性^[67]，已被广泛应用于微生物群落多样性研究中^[68-69]。Lee 等^[70]采用 Illumina Miseq 平台对韩国首尔某大学校园空气中曲霉属真菌丰度进行了检测，结果表明总共有 4 187 个 ITS1 序列和 35 741 个 BenA 序列属于曲霉属真菌。基于 ITS1 和 BenA 序列，所有检测到的曲霉菌种的相对丰度分别为 0.4% 和 6.8%，分别鉴定到 13 和 46 个物种。随后，研究者在韩国首尔的 2 个地点进行季节性空气采样，采用 Illumina Miseq 平台对 18 个空气样品对 ITS1 和 BenA 序列进行高通量测序，结果显示烟曲霉是最优势种，平均相对丰度分别为 1.2% 和 5.5%。共检测出 29 种曲霉菌种，其中 9 种为已知的机会性病原菌^[71]。胥伟等^[72]通过人工促霉培养和 Illumina Miseq 高通量测序技术研究黑毛茶霉变过程的真菌多样性，结果表明在高湿条件下曲霉属真菌相对丰度值最大 (>98%)，是

导致仓储黑毛茶霉变的优势真菌种群。赵仁亮等^[73]采用 Illumina Miseq 技术对不同地域加工的茯砖茶中发花微生物群落结构进行了解析，检测结果发现在真菌中曲霉属是绝对优势菌种，在每个样品中的丰度均在 92% 以上。目前还未见利用高通量测序技术对中药材污染真菌进行检测的相关文献报道，高通量测序技术在微生物检测中的广泛应用为中药材污染真菌检测与鉴定提供了新的思路。利用高通量测序技术对中药材污染真菌进行检测和分析，将克服传统真菌分离鉴定的困难，可在短时期内获得大量中药材污染真菌序列数据。通过分析不同种类中药材在不同产地、不同售卖地区真菌分布多样性的差异，充分了解中药材污染产毒真菌的情况，绘制中药材污染产毒真菌分布全景图并构建中药材污染产毒真菌鉴定标准序列数据库，可实现中药材产毒真菌的快速检测和动态监控，对污染中药材进行早期风险预警。

参考文献

- [1] 应光耀, 赵雪, 王金璐, 等. “药对”技术在中药材防霉养护中的应用与展望 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2768-2773.
- [2] Turner N W, Bramhmbhatt H, Szabo-Vezse M, et al. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009—2014) [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 901: 12-33.
- [3] 黄晓静, 王少敏, 毛丹, 等. 曲霉属真菌毒素的毒性研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(5): 1679-1687.
- [4] 张鑫, 王福, 陈鸿平, 等. 中药材真菌及真菌毒素污染研究现状 [J]. 世界科学技术—中医药现代化,

- 2015, 17(11): 2381-2388.
- [5] 陈 勇, 陈重均, 李 劲, 等. 超高效液相色谱串联质谱法检测三七药材中 10 种真菌毒素 [J]. 药学报, 2015, 50(1): 81-85.
- [6] Micheli P A. *Nova Plantarvm Genera Ivxta Tovrnefortii Methodvm Disposita* [M]. Florence: Typis Bernardi Paperinii, 1729.
- [7] Haller A V. *Historia Stirpium Indigenarum Helvetiae Inchoata* [M]. Bernae: Sumptibus Societatis Typographicae, 1768.
- [8] Fries E M. *Systema Mycologicum, Sistens Fungorum Ordines, Genera et Species* [M]. Gryphiswaldiae: Sumtibus Ernesti Mauritti, 1823.
- [9] Raper K B, Fennell D I. *The Genus Aspergillus* [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965.
- [10] Gams W, Christensen M, Onions A H, *et al.* Infrageneric taxa of *Aspergillus* [A] // Samson R A, Pitt J I. *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* [M]. Boston: Springer, 1986.
- [11] Houbraken J, de Vries R P, Samson R A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species [J]. *Adv Appl Microbiol*, 2014, 86: 199-249.
- [12] Samson R A, Visagie C M, Houbraken J, *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus* [J]. *Stud Mycol*, 2014, 78: 141-173.
- [13] Visagie C M, Varga J, Houbraken J, *et al.* Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*) [J]. *Stud Mycol*, 2014, 78: 1-61.
- [14] Hubka V, Nováková A, Kolařík M, *et al.* Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: Seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov [J]. *Mycologia*, 2015, 107(1): 169-208.
- [15] Chen A J, Frisvad J C, Sun B D, *et al.* *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): Polyphasic taxonomy, chemistry and biology [J]. *Stud Mycol*, 2016, 84: 1-118.
- [16] Chen A J, Hubka V, Frisvad J C, *et al.* Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food [J]. *Stud Mycol*, 2017, 88: 37-135.
- [17] Kocsubé S, Perrone G, Magistà D, *et al.* *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles [J]. *Stud Mycol*, 2016, 85: 199-213.
- [18] McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: The traditional approach [J]. *Med Mycol*, 2005, 43(Suppl1): 125-128.
- [19] Diba K, Kordbacheh P, Mirhendi S H, *et al.* Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics [J]. *Pak J Med Sci*, 2007, 23(6): 867-872.
- [20] Nyongesa B W, Okoth S, Ayugi V. Identification key for *Aspergillus* species isolated from maize and soil of Nandi County, Kenya [J]. *Adv Microbiol*, 2015, 5(4): 205-229.
- [21] 时圣明, 潘明佳, 王 洁, 等. 分子鉴定技术在中药中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3121-3126.
- [22] Healy M, Reece K, Walton D, *et al.* Identification to the species level and differentiation between strains of *Aspergillus* clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(9): 4016-4024.
- [23] Perrone G, Susca A, Epifani F, *et al.* AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* section *Nigri* from grapes [J]. *Int J Food Microbiol*, 2006, 111(S1): 22-27.
- [24] Susca A, Stea G, Perrone G. Rapid polymerase chain reaction (PCR)-single-stranded conformational polymorphism (SSCP) screening method for the identification of *Aspergillus* section *Nigri* species by the detection of calmodulin nucleotide variations [J]. *Food Addit Contam*, 2007, 24(10): 1148-1153.
- [25] Passone M A, Rosso L C, Ciancio A, *et al.* Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real-time PCR of *nor-1* gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production [J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 138(3): 276-281.
- [26] Kanbe T, Yamaki K, Kikuchi A. Identification of the pathogenic *Aspergillus* species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene [J]. *Microbiol Immunol*, 2002, 46(12): 841-848.
- [27] Gil-Serna J, Vázquez C, Sardiñas N, *et al.* Discrimination of the main ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* section *Circumdati* by specific PCR assays [J]. *Int J Food Microbiol*, 2009, 136(1): 83-87.
- [28] Palumbo J D, O'keeffe T L. Detection and discrimination of four *Aspergillus* section *Nigri* species by PCR [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2015, 60(2): 188-195.
- [29] Libert X, Chasseur C, Bladt S, *et al.* Development and performance assessment of a qualitative SYBR[®] green real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus versicolor* in indoor air [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(17): 7267-7282.
- [30] 张 健, 王小霞, 朱柳杨, 等. 产赭曲霉毒素 A 黑曲霉的 PCR 法检测 [J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2530-2538.
- [31] Diba K, Mirhendi H, Kordbacheh P, *et al.* Development

- of RFLP-PCR method for the identification of medically important *Aspergillus* species using single restriction enzyme *MwoI* [J]. *Braz J Microbiol*, 2014, 45(2): 503-507.
- [32] 张彩云, 黄珊珊, 颜海飞. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2306-2312.
- [33] Geiser D M, Klich M A, Frisvad J C, *et al.* The current status of species recognition and identification in *Aspergillus* [J]. *Stud Mycol*, 2007, 59: 1-10.
- [34] Schoch C L, Seifert K A, Huhndorf S, *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(16): 6241-6246.
- [35] 王 欢, 曲 芬. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在真菌快速鉴定中的应用 [J]. 传染病信息, 2016(3): 129-132.
- [36] Hettick J M, Green B J, Buskirk A D, *et al.* Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting [J]. *Anal Biochem*, 2008, 380(2): 276-281.
- [37] Verwer P E B, Van Leeuwen W B, Girard V, *et al.* Discrimination of *Aspergillus lentulus* from *Aspergillus fumigatus* by Raman spectroscopy and MALDI-TOF MS [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014, 33(2): 245-251.
- [38] De Respinis S, WeiBenhorn S, Bosshard P P, *et al.* Identification of some *Aspergillus* species in the *Flavi* and *Fumigati* sections by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry [J]. *J Fungal Res*, 2015, 13(4): 269-283.
- [39] Garon D, E I Kaddoumi A, Carayon A, *et al.* FT-IR spectroscopy for rapid differentiation of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* and characterization of aflatoxigenic isolates collected from agricultural environments [J]. *Mycopathologia*, 2010, 170(2): 131-142.
- [40] Tralamazza S M, Bozza A, Destro J G R, *et al.* Potential of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) to differentiate environmental *Aspergillus* fungi species *A. niger*, *A. ochraceus*, and *A. westerdijkiae* using two different methodologies [J]. *Appl Spectrosc*, 2013, 67(3): 274-278.
- [41] 秦海军, 张 毅, 马 玲, 等. 吴茱萸药材霉变前后的质量变化 [J]. 安徽医药, 2013, 17(6): 952-953.
- [42] 孙 欢, 刘胜兰, 胡 纲, 等. 当归药材霉变前后质量变化研究 [J]. 中国药业, 2016, 25(1): 44-46.
- [43] 曹 艺, 谭周进, 夏伯候, 等. 10 种微生物对含马兜铃酸 A 中药材的生物减毒研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(10): 1939-1944.
- [44] 陈 娟, 高微微, 唐 丹, 等. 赭曲霉毒素 A 污染的 7 种根类药材中污染真菌的分析 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20): 2647-2651.
- [45] Chen A J, Huang L F, Wang L Z, *et al.* Occurrence of toxigenic fungi in ochratoxin A contaminated liquorice root [J]. *Food Addit Contam A*, 2011, 28(8): 1091-1097.
- [46] 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.
- [47] 秦筱茂. 九种药材中真菌种类及污染真菌毒素初探 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.
- [48] 宋美芳, 陈 娟, 李学兰, 等. 云南地区三七和草果上真菌污染的初步分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1734-1737.
- [49] 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.
- [50] 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, doi: 10.1186/s13020-016-0124-7.
- [51] 王 福. 陈皮真菌与药效物质基础变化的相关性研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
- [52] 苏春燕, 魏江春, 胡永建, 等. 三种根类药材上污染真菌的分离方法优化 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(5): 688-692.
- [53] Kong W, Wei R, Logrieco A F, *et al.* Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets [J]. *Food Chem*, 2014, 146: 320-326.
- [54] Rizzo I, Vedoya G, Maurutto S, *et al.* Assessment of toxigenic fungi on *Argentinean* medicinal herbs [J]. *Microbiol Res*, 2004, 159(2): 113-120.
- [55] Bugno A, Almodovar A A B, Pereira T C, *et al.* Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs [J]. *Braz J Microbiol*, 2006, 37(1): 47-51.
- [56] Katerere D R, Stockenström S, Thembo K M, *et al.* A preliminary survey of mycological and fumonisin and aflatoxin contamination of African traditional herbal medicines sold in South Africa [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2008, 27(11): 793-798.
- [57] Gautam A K, Bhadauria R. Fungal and mycotoxin contamination of some common stored herbal fruit samples [J]. *J Indian Bot Soc*, 2010, 89(1/2): 74-79.
- [58] Rajeshwari P, Raveesha K A. Mycological analysis and aflatoxin B₁ contaminant estimation of herbal drug raw materials [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2016,

- 13(5): 123-131.
- [59] Al-juraifani A A. Natural occurrence of fungi and aflatoxins of cinnamon in the Saudi Arabia [J]. *Afr J Food Sci*, 2011, 5(8): 460-465.
- [60] Toma F M, Abdulla N Q F. Isolation and identification of fungi from spices and medicinal plants [J]. *Res J Environ Earth Sci*, 2013, 5(3): 131-138.
- [61] 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 Bio*, 2014, 118(9/10): 776-784.
- [62] 李峻媛, 万 丽, 杨美华. 真菌毒素限量标准及其在中药中的研究进展 [J]. *中草药*, 2011, 42(3):602-609.
- [63] Tindall B J. Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, 66(1/3): 199-202.
- [64] Rodrigues P, Venâncio A, Kozakiewicz Z, *et al.* A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds [J]. *Int J Food Microbiol*, 2009, 129(2): 187-193.
- [65] Masih A, Singh P K, Kathuria S, *et al.* Identification by molecular methods and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and antifungal susceptibility profiles of clinically significant rare *Aspergillus species* in a referral chest hospital in Delhi, India [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(9): 2354-2364.
- [66] 白飞荣, 姚 粟, 凌 空, 等. 黄曲霉和米曲霉的多相鉴定方法 [J]. *微生物学通报*, 2018, 45(1): 215-226.
- [67] 牛世全, 龙 洋, 李海云, 等. 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析河西走廊地区盐碱土壤微生物多样性 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(9): 2067-2078.
- [68] Liu S P, Mao J, Liu Y Y, *et al.* Bacterial succession and the dynamics of volatile compounds during the fermentation of Chinese rice wine from Shaoxing region [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2015, 31(12): 1907-1921.
- [69] Sun W, Xiao H, Peng Q, *et al.* Analysis of bacterial diversity of Chinese Luzhou-flavor liquor brewed in different seasons by Illumina Miseq sequencing [J]. *Ann Microbiol*, 2016, 66(3): 1-9.
- [70] Lee S, Yamamoto N. Accuracy of the high-throughput amplicon sequencing to identify species within the genus *Aspergillus* [J]. *Fungal Biol*, 2015, 119(12): 1311-1321.
- [71] Lee S, An C, Xu S, *et al.* High-throughput sequencing reveals unprecedented diversities of *Aspergillus* species in outdoor air [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2016, 63(3): 165-171.
- [72] 胥 伟, 姜依何, 吴 丹, 等. 高通量测序研究霉变黑毛茶的真菌多样性 [J]. *茶叶科学*, 2017, 37(5): 483-492.
- [73] 赵仁亮, 胥 伟, 吴 丹, 等. 基于 IlluminaMiSeq 技术分析不同地域加工的茯砖茶中微生物群落多样性 [J]. *生态学杂志*, 2017, 36(7): 1865-1876.