

基于高通量测序中江丹参“发汗”过程中优势微生物群落与主要药效成分相关性研究

王晓宇^{1,2,3}, 张松林^{1,2,3}, 王 颖⁴, 郭俊霞^{1,2,3}, 吴 萍^{1,2,3}, 李青苗^{1,2,3*}

1. 四川省中医药科学院, 四川 成都 610041

2. 四川省道地药材系统开发工程技术研究中心, 四川 成都 610041

3. 中药材品质及创新中药研究四川省重点实验室, 四川 成都 610041

4. 资阳市食品药品检验检测中心, 四川 资阳 641399

摘要: **目的** 探究中江丹参 *Salvia miltiorrhiza* “发汗”过程中主要微生物群落及变化特征, 以及优势微生物群落与主要药效成分之间的关系, 以科学阐释传统“发汗”加工方式对中江丹参品质的影响。 **方法** 采用高通量测序技术对“发汗”过程中中江丹参的微生物多样性进行研究, 结合化学品质分析, 将优势微生物群落丰度与“发汗”丹参主要药效成分含量相关联, 以期进一步判定“发汗”过程中影响中江丹参药材品质的主要微生物群落。 **结果** 21 个中江丹参“发汗”样品共检出 221 个真菌菌属, 677 个细菌菌属。“发汗”过程中始终存在的优势真菌有小戴卫霉属 *Davidiella*、轮枝菌属 *Verticillium*; 优势细菌有绿菌门未归类菌属 *Chloroplast_unclassified* 和根瘤菌属未归类菌属 *Mitochondria_unclassified* 2 个未归类菌属, 已知细菌有节细菌属 *Arthrobacter*、链霉菌属 *Streptomyces* 等。同时, 相关性研究表明, 真菌小戴卫霉属与样品中紫草酸含量呈显著负相关; 子囊菌门未归类菌属 *Ascomycota_unclassified* 与丹参酮 II_A 含量呈显著正相关。细菌绿菌门未归类菌属绿菌门未归类与样品中迷迭香酸、水溶性成分含量呈显著正相关; 与丹酚酸 B 含量呈极显著正相关; 与丹参酮 I 含量呈显著负相关。根瘤菌属菌群 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* 与紫草酸含量呈显著正相关。 **结论** 影响“发汗”中江丹参品质的微生物群落可能为真菌小戴卫霉属, 子囊菌门未归类菌属及细菌绿菌门未归类菌属, 为探究中江丹参“发汗”过程中微生物的群落特征提供了实验依据, 为进一步筛选分离“发汗”过程中影响中江丹参品质的优势微生物奠定了基础。

关键词: 高通量测序; 发汗; 中江丹参; 微生物群落; 药效成分; 相关性; 微生物多样性; 真菌; 细菌; 紫草酸; 丹参酮 II_A; 迷迭香酸; 丹酚酸 B; 丹参酮 I

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)02-0420-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.008

Correlation between dominant microbial communities and major medicinal compositions in *Salvia miltiorrhiza* from Zhongjiang processed by “sweating” based on high-throughput sequencing

WANG Xiaoyu^{1,2,3}, ZHANG Songlin^{1,2,3}, WANG Ying⁴, GUO Junxia^{1,2,3}, WU Ping^{1,2,3}, LI Qingmiao^{1,2,3}

1. Sichuan Academy of Chinese Medicine Science, Chengdu 610041, China

2. System Development Engineering Technology Researching Center of Daodi Chinese Medicinal Materials in Sichuan Province, Chengdu 610041, China

3. Key Laboratory on Quality and Innovation of Traditional Chinese Medicine in Sichuan Province, Chengdu 610041, China

4. Food and Drug Inspection and Testing Center in Ziyang, Ziyang 641399, China

Abstract: Objective To explore the main microbial community and its change characteristics during the “sweating” process of *Salvia miltiorrhiza* from Zhongjiang, as well as the relationship between the dominant microbial communities and the main medicinal compositions, so as to scientifically explain the effect of traditional “sweating” processing method on the quality of *S. miltiorrhiza*

收稿日期: 2023-06-27

基金项目: 国家中医药管理局中央财政转移支付地方项目 (A-2023N-7); 四川省中医药管理局科学技术研究专项 (2021MS027); 四川省基本科研业务专项 (2022JDKY0013); 四川省中央引导地方科技发展专项项目 (2022ZYD0106)

作者简介: 王晓宇 (1984—), 女, 新疆石河子人, 副研究员, 研究方向为中药化学成分与质量标准化研究。E-mail: wangxiaoyu926@163.com

*通信作者: 李青苗 (1976—), 女, 研究员, 研究方向为中药材优质高效生产理论与技术研究。E-mail: qingmiao@163.com

from Zhongjiang. **Methods** The high throughput sequencing technology was used to study the microbial diversity in the process of “sweating” of *S. miltiorrhiza* from Zhongjiang. Combined with chemical quality analysis, the abundance ratio of dominant microbial community was correlated with the content of main medicinal compositions of *S. miltiorrhiza* from Zhongjiang processed by “sweating” for the purpose of further determining the main microbial community affecting the quality of *S. miltiorrhiza* from Zhongjiang processed by “sweating”. **Results** In this research, 221 genera of fungi and 677 genera of bacteria were identified in 21 samples of *S. miltiorrhiza* from Zhongjiang processed by “sweating”. The dominant fungal genera that always existed in the process of “sweating” were *Davidiella* and *Verticillium*. The primary bacterial genus included *Chloroplast_unclassified* and *Mitochondria_unclassified* genus, and the known bacterial genus include *Arthrobacter* and *Streptomyces*, etc. At the same time, the correlation studies showed that the fungal species *Davidiella* had a significant negative correlation with the content of alkannic acid in “sweating” samples. There was a significant positive correlation between *Ascomycota_unclassified* and the content of tanshinone II_A. The bacterial genus *Chloroplast_unclassified* showed significant positive correlation with the contents of rosmarinic acid and the water-soluble components in “sweating” samples, was positively correlated with the content of salvianolic acid B. There was a significant negative correlation with the content of tanshinone I. There was a significant positive correlation between *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* and the content of alkannic acid. **Conclusion** The microbial communities that affected the quality of *S. miltiorrhiza* processed by “sweating” may be the fungal species *Davidiella*, *Ascomycota_unclassified* and bacterial genus *Chloroplast_unclassified*. The study provided an experimental basis for exploring the community characteristics of the dominant microorganisms in *S. miltiorrhiza* from Zhongjiang processed by “sweating”, and laid a foundation for further screening and isolating the dominant microorganisms affecting the quality of *S. miltiorrhiza* from Zhongjiang processed by “sweating”.

Key words: high-throughput sequencing; sweating process; *Salvia miltiorrhiza* from Zhongjiang; microbial communities; medicinal compositions; correlation; microbial diversity; fungal; bacterial; alkannic acid; tanshinone II_A; rosmarinic acid; salvianolic acid B; tanshinone I

“发汗”是道地药材产区传统加工炮制技术之一，是产地初加工长期生产实践和经验积累的智慧结晶。即将新鲜药材稍加热或部分干燥后，堆积发热，使其内部水分向外蒸发，凝成水珠附于药材表面，如人体出汗，故称为“发汗”^[1]。研究表明，“发汗”加工可使药材内部水分重新分布，加快干燥速度；促进药效成分的生物与化学转化；改善药材外观、质地、气味、药性等，进而影响药理作用等^[2-5]。随着温、湿度变化，“发汗”过程中药材的微生物群落结构和多样性也发生变化，进而改变药效成分及药理作用^[6-10]。

丹参为唇形科丹参属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎，具有活血化瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈之功^[11]。丹参“发汗”后，药材条直，表面呈暗红棕色，断面变紫，目前，中江丹参道地产区仍有沿用“发汗”加工法的传统，明代李时珍认为“丹参，其根皮丹而肉紫”^[12]，而中江丹参经“发汗”处理断面多为棕褐色或紫褐色，通常被认为是质量上乘的性状指标^[13-15]。目前，关于中药“发汗”过程中微生物群落结构特征及其对药效成分影响的相关研究较少。因此，本研究采用高通量扩增测序技术，探索“发汗”过程中江丹参药材的微生物群落特征及变化规律，并结合化学品

质分析，深入探究优势微生物群落与中江丹参药效成分之间的相关性，旨在寻找影响中江丹参药材品质相关的优势微生物群落，为中江丹参“发汗”这一特色产地加工技术的科学内涵提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Analytik Jena-q Tower 2.2 型荧光定量 PCR 仪，德国 Analytik Jena AG 公司；Agilent 1260 型高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；XS205 型电子分析天平，十万分之一，瑞士 Mettler Toledo 股份有限公司；KQ2200 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；DHG-9240 型电热恒温鼓风干燥箱，上海一恒科学仪器有限公司；BSA224S 型电子分析天平，万分之一，德国 Sartorius 股份有限公司；DFY-200 型摇摆式高速万能粉碎机，浙江温岭市林大机械有限公司；药典筛，四号筛，0.25 μm 孔径，浙江上虞市道墟化验仪器设备厂；微孔滤膜，0.45 μm 孔径，有机尼龙 66，天津市科亿隆实验设备有限公司；c-DNA 提取试剂盒，北京艾德莱生物科技有限公司。

1.2 材料

1.2.1 对照品及试剂 对照品丹参素钠（质量分数

99.87%，批号 MUST-21051206)、迷迭香酸(质量分数 99.43%，批号 MUST-21111817)、紫草酸(质量分数 97.71%，批号 MUST-21102314)、丹酚酸 B(质量分数 98.60%，批号 MUST-22030107)、二氢丹参酮 I(质量分数 98.16%，批号 MUST-21102911)、隐丹参酮(质量分数 98.91%，批号 MUST-22033008)、丹参酮 I(质量分数 99.09%，批号 MUST-21042207)、丹参酮 II_A(质量分数 99.91%，批号 MUST-21071310)，均购自四川成都曼斯特生物科技有限公司。超纯水、甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯。

1.2.2 药材及加工处理 丹参样品于 2023 年 2 月采集于四川省德阳市中江县集凤镇小脚坡村(E104°67', N31°03')，选取同一农户、同一地块中江丹参植株若干，除去地上部分，取中江丹参地下根和根茎，趁鲜带回，经四川省中医药科学院李青苗研究员鉴定为唇形科丹参属植物丹参 *S. miltiorrhiza* Bge. 的根及根茎。通过混样将所有地下根和根茎平均分为 10 份，随机取其中 2 份，设置为实验空白样品，不作任何处理。

本实验以丹参大部分根茎断面变棕褐或紫褐色，作为评定“发汗”结束的标准。模拟中江丹参种植农户的传统“发汗”方式，总计堆置“发汗”时长为 10 d。设定“发汗”每满 5 d 取样 1 次，第 1 次取样后将样品敞开摊晾 2 d，再次“发汗”5 d，完成第 2 次取样。样品共计 21 个，分别标记为 A(新鲜样品，0 d)、B(第 1 次发汗 5 d，各样品分别编号 B1~B10)、C(第 2 次发汗 5 d，各样品分别编号 C1~C10)。各样品取后立即存放在-80℃低温冰箱中冷冻，备用。样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 样品 DNA 的提取

中江丹参“发汗”过程中样品的真菌 ITS 区及细菌 V1~V9 区基因测序，由成都丹凤科技有限公司完成。将所有待测样品在无菌条件下用液氮研磨仪研成细粉后，平均分为 3 份，用 c-DNA 提取试剂盒按照试剂盒的使用说明，提取 DNA^[16-17]，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量。

2.2 PCR 扩增和 Miseq 测序

真菌的扩增区域为 ITS1 区，引物为 ITS1F(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4-R(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')；反应体系为 pMD18-T 0.5 μL，QPCR 扩增产物 4.5 μL，T4 DNA

表 1 中江丹参样品信息

Table 1 Information of *S. miltiorrhiza* from Zhongjiang

样品编号	堆置环境	堆置高度	覆盖材料	“发汗”时间/d
A	未设置	未设置	未设置	0
B1	室内阴凉通风	15 cm	白色塑料编织袋	5
B2	室内阴凉通风	20 cm	白色塑料编织袋	5
B3	室内阴凉通风	15 cm	黑色塑料薄膜	5
B4	室内阴凉通风	20 cm	黑色塑料薄膜	5
B5	室内阴凉通风	未设置	不覆盖材料	5
B6	室外光照空旷	15 cm	白色塑料编织袋	5
B7	室外光照空旷	20 cm	白色塑料编织袋	5
B8	室外光照空旷	15 cm	黑色塑料薄膜	5
B9	室外光照空旷	20 cm	黑色塑料薄膜	5
B10	室外光照空旷	未设置	不覆盖材料	5
C1	室内阴凉通风	15 cm	白色塑料编织袋	10
C2	室内阴凉通风	20 cm	白色塑料编织袋	10
C3	室内阴凉通风	15 cm	黑色塑料薄膜	10
C4	室内阴凉通风	20 cm	黑色塑料薄膜	10
C5	室内阴凉通风	未设置	不覆盖材料	10
C6	室外光照空旷	15 cm	白色塑料编织袋	10
C7	室外光照空旷	20 cm	白色塑料编织袋	10
C8	室外光照空旷	15 cm	黑色塑料薄膜	10
C9	室外光照空旷	20 cm	黑色塑料薄膜	10
C10	室外光照空旷	未设置	不覆盖材料	10

连接酶缓冲液 5.0 μL，ddH₂O 补至 10 μL。PCR 反应参数：94℃变性 3 min，94℃变性 20 s，65℃、30 s，72℃、30 s，39 个循环，60~95℃，每个循环增加 1℃，延伸 4 s。

细菌主要针对 16S rDNA 的 V1~V9 区进行扩增，引物为 16S-F(5'-GCTCGTGTCTGAGATGTT-3')和 16S-R(5'-TGTAGCCCAGGTCATAAGG-3')，其他条件与真菌一致。

所有样品的 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测，参照电泳初步定量结果，对目的条带使用索莱宝公司提供的凝胶回收试剂盒回收产物，PCR 产物用 Analyti Kjena-q TOWER 2.2 型荧光定量 PCR 仪进行检测定量。之后按照每个样本的测序量要求，进行相应比例的混合。

2.3 数据分析

将测序结果在 LC-Bio 公司提供的 Illumina NovaSeq 平台上进行分析。使用 Pear 合并读取配对端。根据 fqtrim(v0.94) 获得高质量清洁标签的条

件。筛选嵌合序列采用 Vsearch 软件 (v 2.3.4)。使用 DADA2 进行去重复后, 得到特征表和特征序列。然后选择所有的样品统一按最小样本序列数进行抽平分析, 基于抽平后的数据, 使用 QIIME 2 软件计算 α 多样性指数与 β 多样性指数分析, 采用 R 软件 (v3.5.2) 绘制分析图片, 基于分类学信息, 对各个分类水平上的群落结构进行统计分析。

2.4 不同“发汗”条件下中江丹参中 8 种药效成分的含量测定

2.4.1 对照品溶液的制备

(1) 水溶性成分: 取丹参素钠、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 对照品, 精密称定, 加 75% 甲醇制成含丹参素钠 2.42 mg/mL、迷迭香酸 0.53 mg/mL、紫草酸 0.34 mg/mL、丹酚酸 B 0.19 mg/mL 的混合对照品溶液, 即得, 4 °C 下保存。

(2) 脂溶性成分: 取二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 对照品, 精密称定, 加甲醇制成含二氢丹参酮 I 0.83 mg/mL、隐丹参酮 1.75 mg/mL、丹参酮 I 1.24 mg/mL、丹参酮 II_A 2.48 mg/mL 的混合对照品溶液, 即得, 4 °C 下保存。

2.4.2 供试品溶液的制备

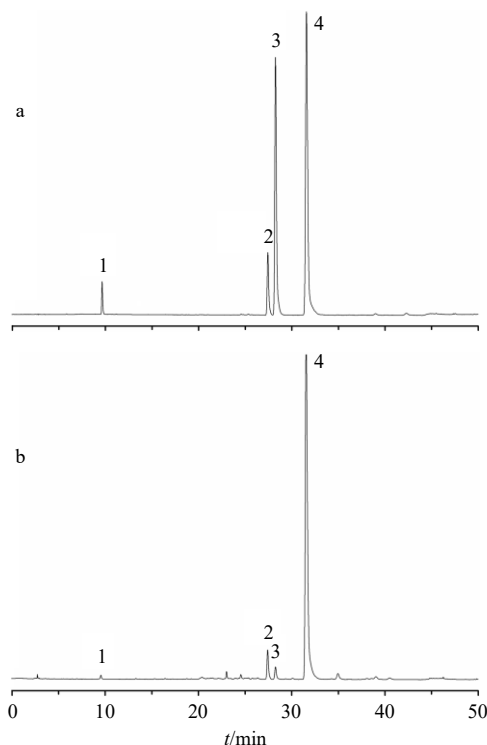
(1) 水溶性成分: 取丹参粉末 (过 4 号筛) 约 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 140 W、频率 42 kHz) 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 75% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得水溶性成分供试品溶液。

(2) 脂溶性成分: 除溶剂为甲醇外, 其他同“2.4.2 (1)”项。

2.4.3 色谱条件^[18]

(1) 水溶性成分 (丹参素钠、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B): 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为 0.1% 磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~20 min, 3%~23% 乙腈; 20~35 min, 23%~25% 乙腈; 35~40 min, 25% 乙腈; 40~50 min, 25%~90% 乙腈; 50~60 min, 90% 乙腈; 检测波长为 286 nm; 柱温为 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μ L。色谱图见图 1。

(2) 脂溶性成分 (二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A): 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为 0.01% 磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~20 min, 20%~60% 乙腈; 20~50 min, 60%~80% 乙腈; 检



a-混合对照品溶液; b-丹参水溶性成分供试品溶液; 1-丹参素钠; 2-迷迭香酸; 3-紫草酸; 4-丹酚酸 B。

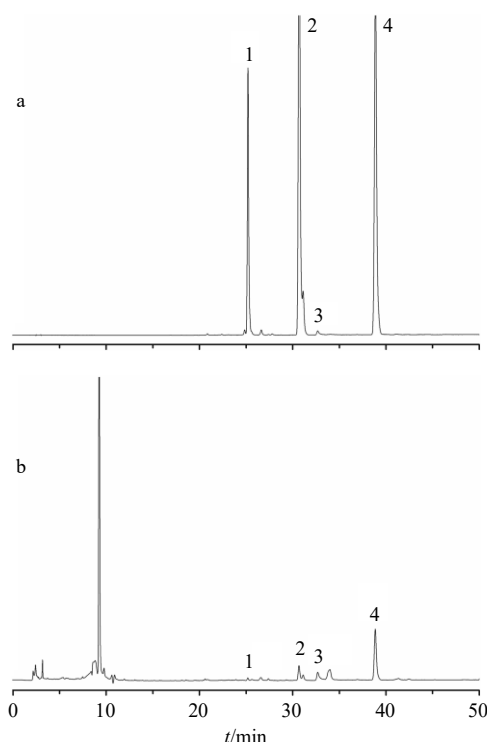
a-mixed reference substances solution; b-*S. miltiorrhiza* hydrosoluble compounds test solution; 1-sodium danshensu; 2-rosmarinic acid; 3-lithospermic acid; 4-lithospermic acid B.

图 1 水溶性成分含量测定 HPLC 图

Fig. 1 HPLC for content determination of hydrosoluble compounds

测波长 270 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μ L。色谱图见图 2。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取“2.4.1”项下对照品溶液 1、3、5、10、15、17 μ L 进样分析, 在“2.4.3”项色谱条件下测定, 以对照品溶液含量为横坐标 (X), 相对峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程: 丹参素钠 $Y=46.275 X-0.585 3$, $r=0.999 9$, 线性范围 2.43~41.26 μ g; 迷迭香酸 $Y=682.740 X-0.257 7$, $r=0.999 9$, 线性范围 0.53~9.09 μ g; 紫草酸 $Y=4 718.20 X+149.85$, $r=0.999 9$, 线性范围 0.34~5.81 μ g; 丹酚酸 B $Y=12 421.0 X+215.69$, $r=0.999 8$, 线性范围 0.19~3.35 μ g; 二氢丹参酮 I $Y=2 365.2 X+487.74$, $r=0.999 9$, 线性范围 0.83~14.25 μ g; 隐丹参酮 $Y=2 424.4 X+2 542.2$, $r=0.999 8$, 线性范围 1.75~29.75 μ g; 丹参酮 I $Y=6.031 8 X+7.171 3$, $r=0.999 8$, 线性范围 1.24~21.15 μ g; 丹参酮 II_A $Y=1 661.10 X+1 287.50$, $r=0.999 7$, 线性范围 2.49~42.31 μ g; 结果表明, 各成



a-混合对照品溶液; b-丹参脂溶性成分供试品溶液; 1-二氢丹参酮 I; 2-隐丹参酮; 3-丹参酮 I; 4-丹参酮 II_A。

a-mixed reference substances solution; b-*S. miltiorrhiza* liposoluble compounds test solution; 1-dihydrotanshinone I; 2-cryptotanshinone; 3-tanshinone I; 4-tanshinone II_A。

图 2 脂溶性成分含量测定 HPLC 图

Fig. 2 HPLC for content determination of liposoluble compounds

分在各自质量浓度范围内呈良好的线性关系。

2.5 结果与分析

2.5.1 高通量测序数据统计及 α 多样性统计 通过对中江丹参“发汗”过程中,不同取样时间点样品进行微生物群落结构和多样性测序分析质控后,真菌共得到 80 835 条有效序列,平均每个样本具有 (80 835 ± 41 742) 条。细菌共 78 666 条有效序列,平均每个样本具有 (76 770 ± 7 490) 条。每个样品的覆盖率均在 95% 以上,表明测序深度均已覆盖到测试样品中的大部分物种,具有可靠的数据质量。对于真菌,中江丹参发汗 5 d 的 B9 样品具有较高的 Shannon 均匀度指数 (4.99),具有较高的 Chao1 指数 (258.00),表明此时真菌群落多样性高;此时真菌物种也最为丰富,说明 9 号样品的发汗条件 (室外光照空旷,黑色塑料薄膜覆盖,堆置高度 20 cm) 在发汗时间 5 d 时,真菌的物种总数和种类明显增加,这可能与此“发汗”条件创造的湿热环境适宜药材中内生真菌快速生长繁殖有关。且折线图显示

Chao1 指数估计发汗 10 d 的所有样品真菌群落丰度显著高于其他样品。结果见图 3。

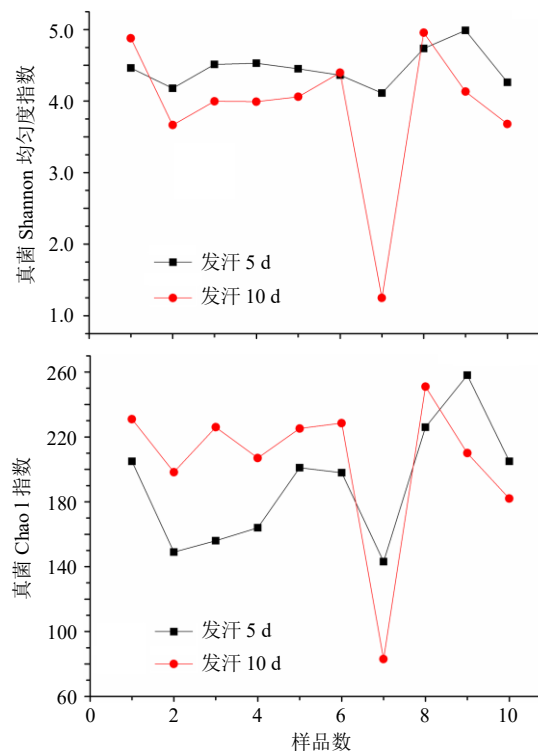


图 3 丹参样品的真菌群落多样性和相对丰度

Fig. 3 Fungal community diversity and relative abundance of *S. miltiorrhiza* samples

由图 4 可知,Chao1 指数估计发汗 5 d 的样品细菌丰度普遍较大,并显著高于 0、10 d 的样品,说明在“发汗”5 d 左右样本中细菌物种总量最高,群落组成最复杂;此外,8 号发汗条件 (室外光照空旷,黑色塑料薄膜覆盖,堆置高度 15 cm) 的样品 Chao1 指数显著高于其他发汗条件样品。Shannon 均匀度指数显示 8 号发汗条件的样品细菌多样性显著高于其他发汗条件样品,并在发汗 5 d 时出现最大值 (3.38),这可能是由于新鲜丹参室外覆膜堆置,加之黑色薄膜聚热较强,为药材表面适合高温生长的细菌创造了活动繁殖的条件。

2.5.2 “发汗”过程中丹参样品微生物群落结构组成及变化规律 将不同“发汗”时间点的微生物根据总的测序结果进行筛选并计算,观察微生物在各时间点的变化趋势。采用 RDP classifier 对各样品中的 OTU 进行门及属水平的信息分析。

(1)“发汗”过程中丹参样品微生物门水平群落组成特征:根据高通量测序结果,从 21 份供试样本中共检测到 6 个真菌菌门,其中主要由子囊菌门 Ascomycota Banani, H.、担子菌门 Basidiomycota

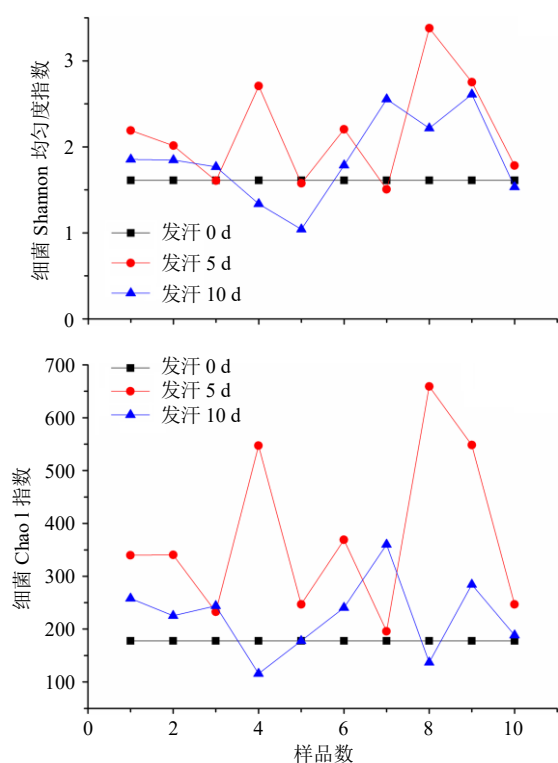


图 4 丹参样品的细菌群落多样性和相对丰度

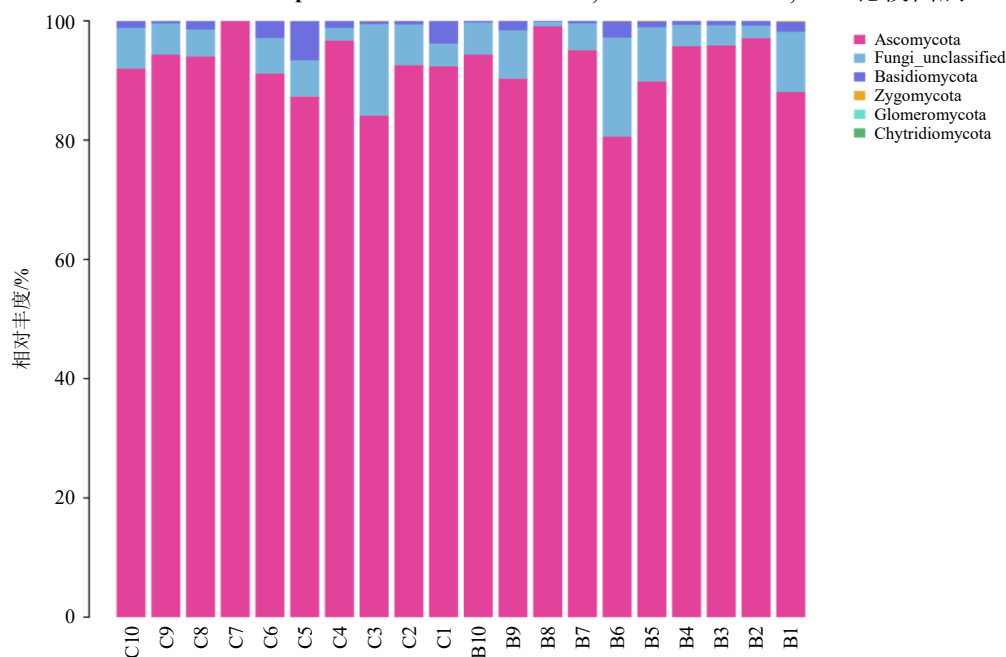
Fig. 4 Bacteria community diversity and relative abundance of *S. miltiorrhiza* samples

图 5 丹参样品门水平上真菌的群落组成

Fig. 5 Community composition of fungi at phylum level of *S. miltiorrhiza* samples

赤霉菌属 *Gibberella* Cuomo, C. A.、富克葡萄孢盘菌属 *Botryotinia* De Guido, M. A.等。“发汗”初期与后期的优势真菌属差异较明显,在已知真菌中,以富克葡萄孢盘菌属相对丰度变化最大(2.098%~

Loftus, B. J.组成,结果见图 5。子囊菌门为中江丹参“发汗”过程中的绝对优势真菌,仅 6 号发汗条件,发汗 5 d 时的丹参样本在 80%左右,其他样品的质量分数均在 85%以上,个别发汗条件接近 100%。担子菌门在 5 号发汗条件,发汗 10 d 的丹参样品中含量最高,为 6.60%,其次在 1 号发汗条件,发汗 10 d 时为 3.83%。

21 个样本共检出门水平上的细菌群落结构主要有 5 个细菌菌门:蓝藻细菌门 *Cyanobacteria* Copeland, A.、变形菌门 *Proteobacteria* Riley, M.、放线菌门 *Actinobacteriota* Lew, J. M.、厚壁菌门 *Firmicutes* Toledo-Arana, A.和拟杆菌门 *Bacteroidota* Naito, M., 结果见图 6,结果表明,新鲜丹参样品和发汗丹参样品中的优势菌均为蓝藻细菌门,质量分数平均在 60%以上,说明蓝藻门的细菌菌落主要参与了丹参的“发汗”过程;其次的优势菌群是变形菌门丰度 17.18%~52.23%,均值为 26.87%。

(2)“发汗”过程中的丹参样品微生物属水平群落组成特征:中江丹参“发汗”过程中 21 个样本共检出 221 个真菌菌属,主要有小戴卫霉属 *Davidiella* Giroux, E. and Bilodeau, G.、轮枝菌属 *Verticillium*、

14.454%), 结果见图 7。

“发汗”初期(0~5 d),通过群落组成分析发现主要以小戴卫霉属相对居多;发汗后期(5~10 d),小戴卫霉属的相对丰度降低,样本丰度较大的真菌

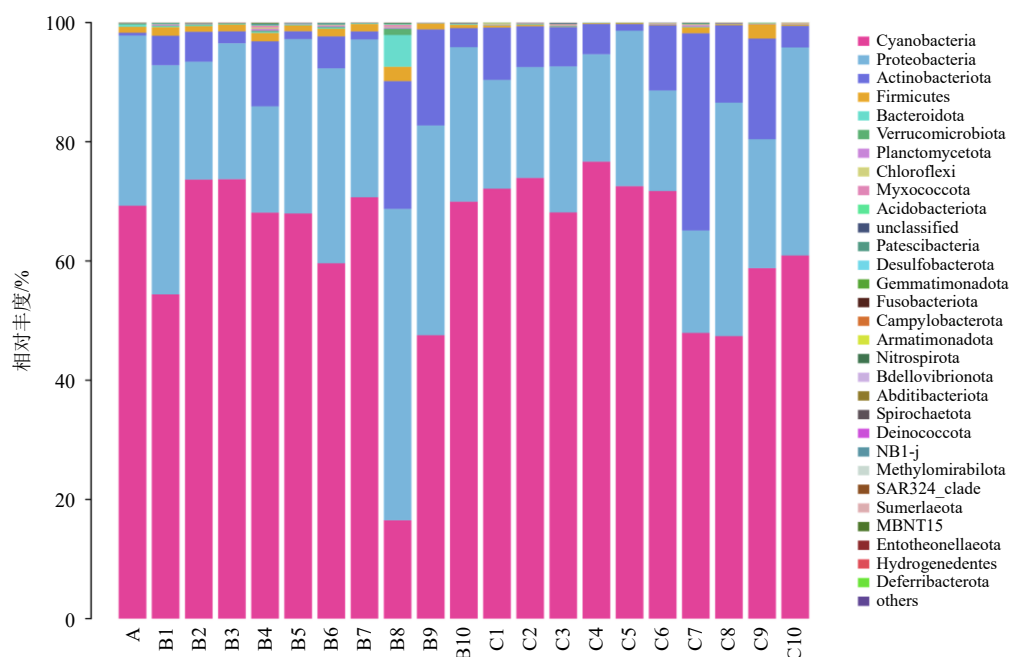


图 6 丹参样品门水平上细菌的群落组成

Fig. 6 Community composition of bacteria at phylum level of *S. miltiorrhiza* samples

菌属变为轮枝菌属。

丹参“发汗”过程中共检出 677 个细菌菌属，已知细菌主要包括节杆菌属 *Arthrobacter*、链霉菌属 *Streptomyces* Ohnishi, Y.、根瘤菌属 *Allorhizobium* Gan, H. M. 等。“发汗”过程中（0~10 d）样本丰度较高的主要是一些无法归类和其他菌属，结果见图 8，主要为绿菌门未归类菌属 *Chloroplast_unclassified* 和根瘤菌属未归类菌属 *Mitochondria_unclassified*，二者在该过程中呈波动变化，其中绿菌门未归类菌属质量分数较高（在 60% 以上）且有逐步增加的趋势；在已知细菌中，以节杆菌属相对丰度变化较大（1.73%~4.04%）。

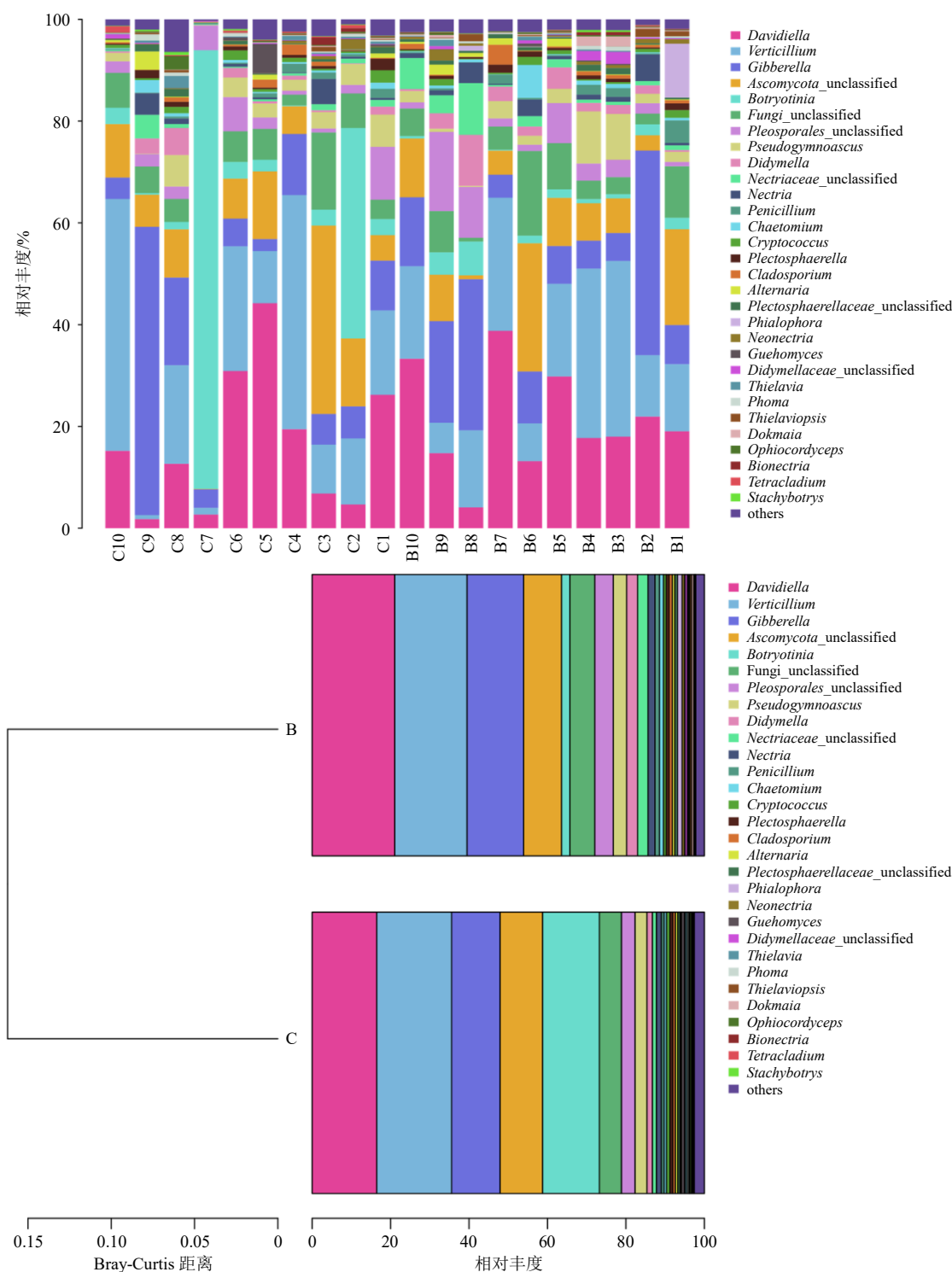
2.5.3 “发汗”过程中的丹参样品微生物属水平相对丰度分布 选取丰度排名为前 30 的真菌属，根据每个样本各属的丰度均值，分别对样本之间真菌相对丰度进行聚类分析，得到 Heatmap 热图。中江丹参“发汗”过程中所有真菌物种中含量前 10 的菌属与“发汗”过程的 21 个样本之间的相互关系，结果见图 9。在前 10 的菌属中，分类不明确的真菌菌属有 4 个。已知真菌属中，小戴卫霉属和轮枝菌属距离比较接近，归属同一分支，两者在所有丹参“发汗”样本中含量均较大，为丹参“发汗”过程中的优势菌属，推测这 2 个真菌菌属在“发汗”过程中可能参与引起丹参药材质量的改变，或者为丹参药材表面“霉菌”的主要菌群。赤霉菌属和子囊菌门

未归类霉属 *Ascomycota_unclassified* 也属于同一分支，并且均在 1~10 d 样本中含量较大，在“发汗”中后期（5~10 d）含量有所降低，在初期（1~5 d）的样本中含量相对较高，推测二者也可能是参与中江丹参“发汗”引起其药材性状、化学成分等改变的主要菌属。

丹参“发汗”过程中样本在属水平上的细菌群落 Heatmap 图，结果见图 10。已知的 7 个细菌属中，节杆菌属和链霉菌属存在于各个样本中，“发汗”过程中（1~10 d）丰度均相对较高。而黄杆菌属 *Flavobacterium* 和埃希氏杆菌属 *Escherichia* 在“发汗”中后期（5~10 d）含量极低，推测二者并非是丹参“发汗”引起药材性状、化学成分改变的主要菌属。

2.5.4 中江丹参“发汗”过程中微生物相对丰度值（属水平上）与其 8 种主要药效成分含量的相关性研究 使用 SPSS 软件做相关性分析，选取丹参样品中 8 种药效成分（丹参素钠、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A）的含量与样品中微生物（真菌、细菌）Top5 的相对丰度值（属水平上）相关联，以期进一步判定“发汗”过程中对丹参药材品质产生影响的优势微生物群落，结果见表 2~4。

结果可见，“发汗”丹参样品属水平上优势真菌 TOP 1 小戴卫霉属与样品中紫草酸含量呈现显著的



B-第 1 次发汗 5 d; C-第 2 次发汗 5 d; 图 8~10 同。

B-the first time of sweating for 5 d; C-the second time of sweating for 5 d; same as figures 8—10.

图 7 丹参样品属水平上真菌的群落组成及不同发汗时间的组间比较

Fig. 7 Fungal community composition at genus level in *S. miltiorrhiza* samples and grouped comparison at different sweating times

负相关关系, 相关系数为 0.353。其次, 优势真菌 TOP 4 子囊菌门未归类霉属与丹参酮 II_A 的含量呈现显著的正相关关系, 相关系数为 0.320。表明, 小戴卫

霉属相对丰度越高, 紫草酸的含量越低。子囊菌门未归类霉属相对丰度越高, 丹参酮 II_A 的含量越高。结果可见, “发汗” 丹参样品属水平上优势细菌

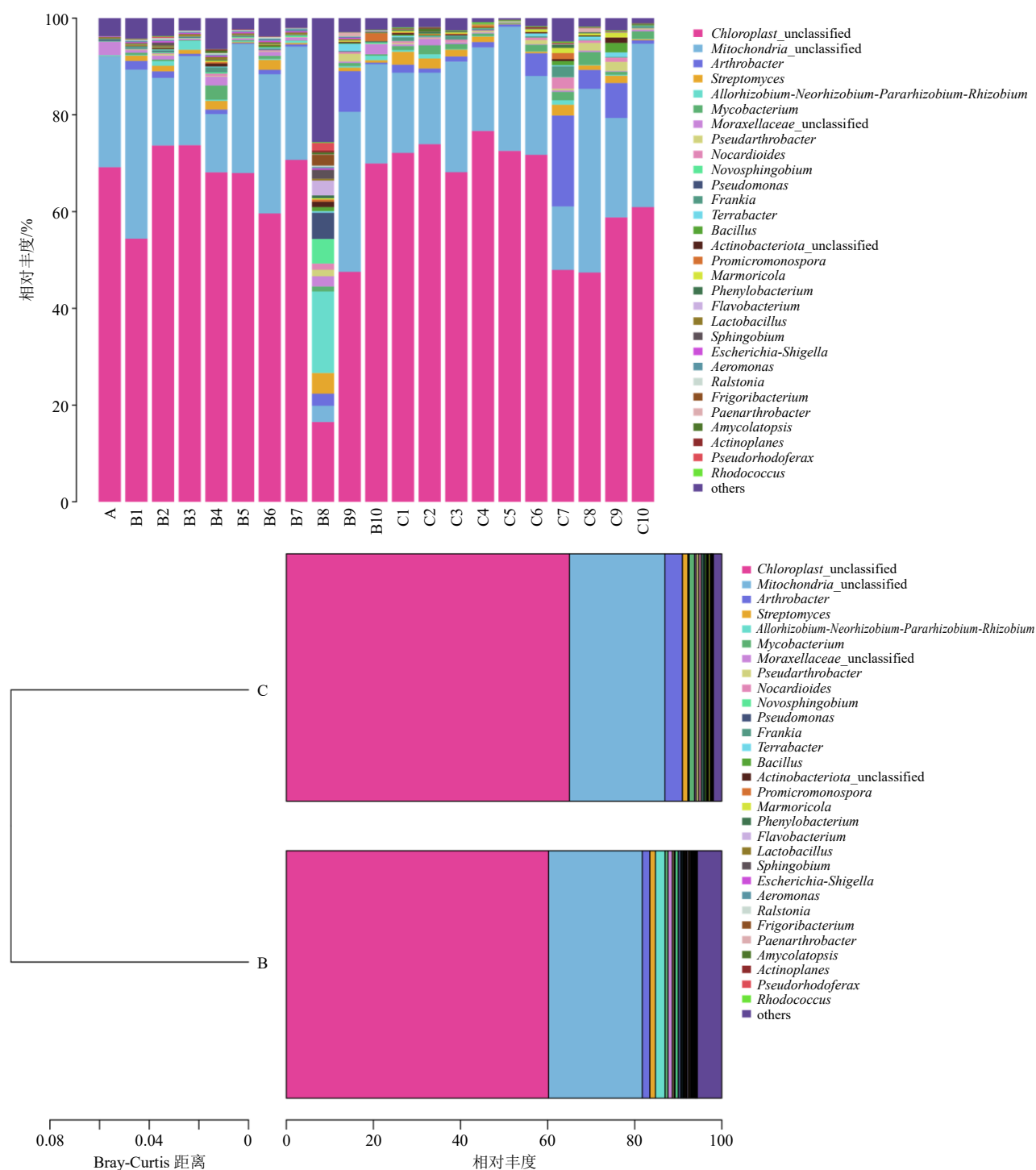


图 8 丹参样品属水平上细菌的群落组成及不同发汗时间的组间比较

Fig. 8 Bacterial community composition at genus level in *S. miltiorrhiza* samples and grouped comparison at different sweating times

TOP 1 绿菌门未归类菌属与样品中迷迭香酸、水溶性成分含量呈显著的正相关关系, 相关系数分别为 0.330、0.379; 与丹酚酸 B 含量呈极显著的正相关关系, 相关系数为 0.434; 与丹参酮 I 含量呈显著的负相关关系, 相关系数为 0.392。其次, 优势细菌 TOP 5 根瘤菌属菌群 *Allorhizobium-Neorhizobium-*

Pararhizobium-Rhizobium 与紫草酸的含量呈显著的正相关关系, 相关系数为 0.461。表明绿菌门未归类相对丰度越高, 迷迭香酸、丹酚酸 B、水溶性成分的含量越高, 丹参酮 I 含量越低。根瘤菌属菌群 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* 相对丰度越高, 紫草酸的含量越高。

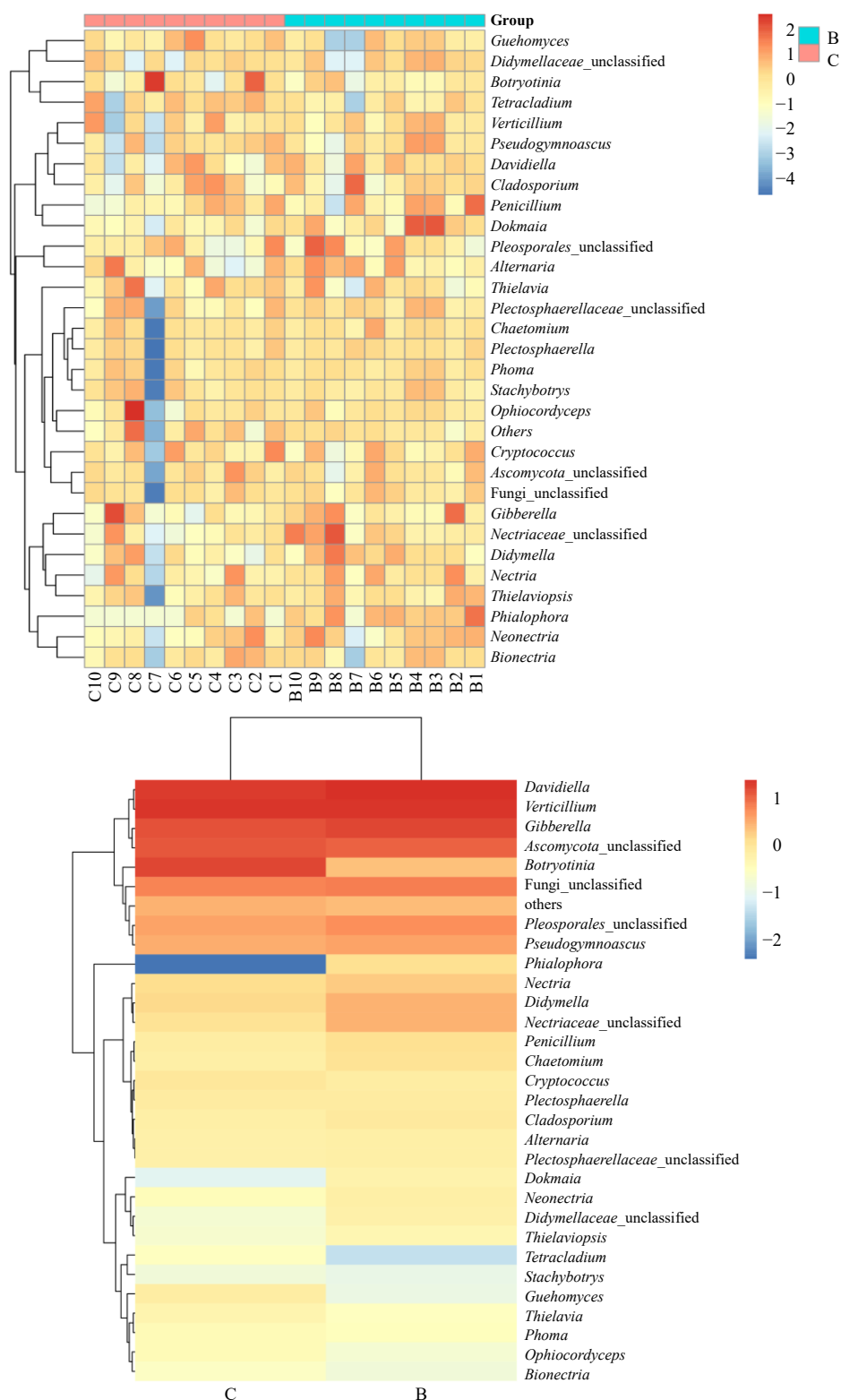


图 9 丹参样品属水平上真菌群落热图及不同发汗时间的组间比较

Fig. 9 Heatmap of fungal community at genus level in *S. miltiorrhiza* samples and grouped comparison at different sweating times

3 讨论

人类认识微生物群落的参与协同作用古已有之，并延续至今。如食品发酵、酿酒酿造、中药炮

制等^[19-23]，现代学者将微生物资源与中药品质相结合，发现其具有变色、提质、减毒、增效等作用。如杨放晴等^[24]发现陈皮表面的曲霉属 *Aspergillus* 是

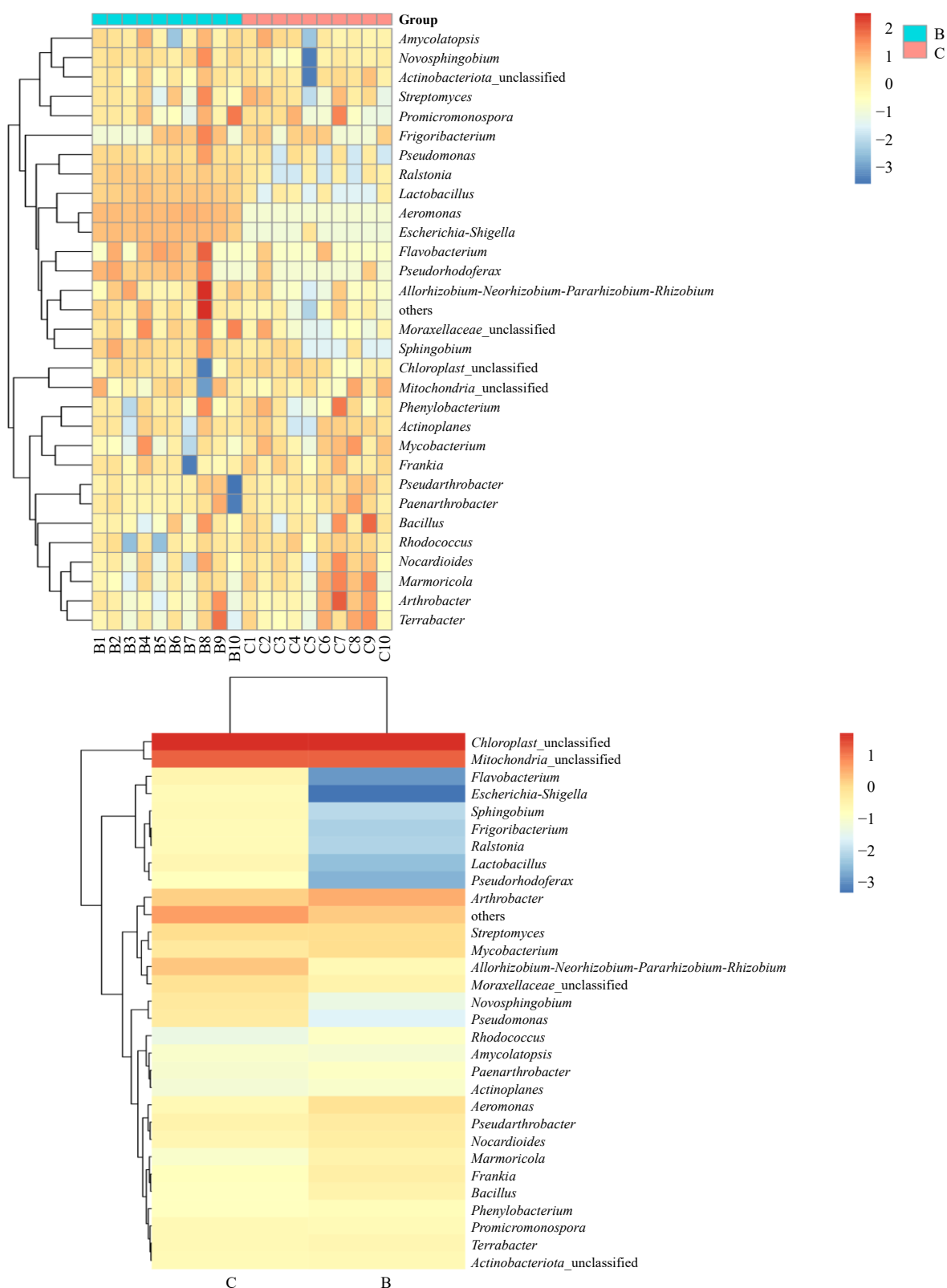


图 10 丹参样品属水平上细菌群落热图及不同发汗时间的组间比较

Fig. 10 Heatmap of bacterial community at genus level in *S. miltiorrhiza* samples and grouped comparison at different sweating times

引起黄酮类和挥发油含量与类型变化的重要因素。
陈聪聪^[25]研究发现, 陈皮表面芽孢杆菌属 *Bacillus*、

乳酸链球菌属 *Lactococcus*、假单胞菌属 *Pseudomonas* 等优势细菌可加速其挥发油的生物转化。杨丹等^[26]

表2丹参样品中8种药效成分含量测定结果

Table 2Results of determination of eight pharmacodynamic components in *S. miltiorrhiza* samples

样品名	水溶性成分质量分数/(mg·g ⁻¹)					脂溶性成分质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	丹参素钠	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	总量	二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II _A	总量
A	6.954	2.448	0.321	68.442	78.165	0.049	0.188	0.182	0.751	1.170
B1	5.671	2.314	0.280	53.672	61.937	0.032	0.250	0.207	1.126	1.615
B2	6.012	2.890	0.261	58.611	67.774	0.062	0.341	0.318	1.950	2.671
B3	4.192	2.141	0.260	43.273	49.866	0.048	0.382	0.192	1.842	2.464
B4	4.620	2.322	0.252	44.391	51.585	0.037	0.300	0.211	1.550	2.098
B5	5.282	3.151	0.233	48.120	56.786	0.035	0.379	0.207	1.873	2.494
B6	4.771	2.392	0.251	47.323	54.737	0.036	0.201	0.202	0.966	1.405
B7	4.912	2.810	0.322	49.812	57.856	0.036	0.228	0.319	0.901	1.484
B8	5.670	3.252	0.310	56.601	65.833	0.044	0.200	0.317	0.877	1.438
B9	5.771	2.650	0.343	55.861	64.625	0.032	0.209	0.188	1.021	1.450
B10	5.801	2.783	0.292	59.301	68.177	0.032	0.207	0.191	1.128	1.558
C1	3.772	2.264	0.233	37.180	43.449	0.029	0.231	0.180	1.440	1.880
C2	5.001	2.880	0.239	49.901	58.021	0.056	0.326	0.287	2.162	2.831
C3	3.989	2.071	0.248	39.225	45.533	0.044	0.362	0.171	2.351	2.928
C4	4.435	2.295	0.250	43.415	50.395	0.035	0.258	0.177	1.756	2.226
C5	4.476	3.107	0.205	44.608	52.396	0.034	0.347	0.181	2.228	2.790
C6	4.520	2.384	0.206	44.545	51.655	0.032	0.168	0.174	1.010	1.384
C7	4.872	2.791	0.288	47.776	55.727	0.032	0.201	0.291	0.918	1.442
C8	5.440	3.241	0.286	54.011	62.978	0.042	0.182	0.294	0.961	1.479
C9	5.401	2.638	0.297	53.746	62.082	0.029	0.190	0.166	1.100	1.485
C10	5.770	2.762	0.273	57.634	66.439	0.029	0.183	0.165	1.237	1.614

表3丹参样品优势真菌相对丰度(属水平上)与药效成分含量的相关性分析

Table 3Correlation analysis between relative abundance of dominant fungi (at genus level) and contents of pharmacodynamic components in *S. miltiorrhiza* samples

优势真菌	相关系数									
	丹参素钠	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	水溶性成分总量	二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II _A	脂溶性成分总量
小戴卫霉属 <i>Davidiella</i>	-0.163	0.019	-0.353*	-0.152	-0.152	-0.178	0.262	-0.040	0.272	0.245
轮枝菌属 <i>Verticillium</i>	-0.201	-0.067	-0.177	-0.200	-0.200	-0.010	0.078	0.010	0.091	0.139
赤霉菌属 <i>Gibberella</i>	0.197	0.091	0.182	0.167	-0.167	-0.005	-0.083	0.147	-0.029	-0.019
子囊菌门未归类菌属 <i>Ascomycota_unclassified</i>	-0.086	-0.057	-0.284	-0.076	-0.076	-0.059	0.155	-0.152	0.320*	0.293
富克葡萄孢盘菌属 <i>Botryotinia</i>	-0.057	0.124	-0.186	0.067	-0.067	-0.109	-0.049	0.081	0.100	0.053

P*<0.05, 显著; *P*<0.01, 极显著, 表 4 同。

P* < 0.05, significant; *P* < 0.01, extremely significant, same as table 4.

研究发现,黑曲霉对不同陈化年份广陈皮的黄酮类成分均有一定影响,其中,陈化 2 年广陈皮影响最大,总黄酮、橙皮苷和川陈皮素含量均有增加。魏担等^[6]发现“发汗”后厚朴的“气味浓厚,内表面变为棕褐色”这一性状特征的形成可能与曲霉属和假

丝酵母菌属 *Candida* 等微生物群落代谢有关。吴晓峰^[27]通过 2 种真菌(灵芝菌与白僵菌)对中药巴豆进行发酵,发现发酵品的毒性成分含量明显降低,其组成成分也发生了较大变化;表明发酵对巴豆具有“去毒存效”的作用。陈丽艳等^[28]通过实验发现

表 4 丹参样品优势细菌相对丰度 (属水平上) 与药效成分含量的相关性分析
Table 4 Correlation analysis between relative abundance of dominant bacteria (at genus level) and contents of pharmacodynamic components in *S. miltiorrhiza* samples

优势细菌	相关系数									
	丹参素钠	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	水溶性成分总量	二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II _A	脂溶性成分总量
绿菌门未归类菌属 <i>Chloroplast_unclassified</i>	0.178	0.330*	-0.142	0.434**	0.379*	-0.306	-0.200	-0.392*	-0.276	-0.276
线菌门未归类菌属 <i>Mitochondria_unclassified</i>	-0.198	-0.097	-0.121	-0.053	-0.072	0.134	0.029	0.147	0.143	0.143
节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	-0.218	-0.311	0.020	-0.196	-0.245	-0.086	-0.019	0.137	-0.076	-0.076
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	0.050	0.019	0.233	-0.014	0.024	-0.191	-0.105	-0.069	-0.200	-0.200
根瘤菌属未归类菌属 <i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	0.241	0.152	0.461**	-0.155	-0.058	0.160	0.169	0.313	0.149	0.149

黄芩经侧耳菌和黑曲霉发酵后, 苷类成分被转化为苷元或其他物质, 有利于提高黄芩的生物利用度及药理活性。

传统“发汗”加工为药材产地初加工长期生产实践和经验积累形成的独具特色的产物, 该法可促使药材内部水分重新分布, 加快干燥速度, 同时改变化学成分, 赋予药材独特的品质特征与临床疗效。作为著名川产道地药材, 中江丹参由于多在冬春交替时采收, 雨水较多, 至今“发汗”法仍在当地农民中沿用, 目前尚无关于中江丹参“发汗”过程主要微生物群落的相关研究, 本课题组通过对中江丹参道地产区的实地调研, 模拟当地“发汗”条件及环境, 运用高通量测序技术手段, 结合化学品质分析, 发现中江丹参在“发汗”过程中始终存在的主要已知优势真菌有小戴卫霉属、轮枝菌属、赤霉菌属、富克葡萄孢盘菌属; 主要优势细菌有绿菌门未归类菌属和根瘤菌属未归类菌属的 2 个菌属, 已知优势细菌有节细菌属、链霉菌属、根瘤菌属等。其中, 小戴卫霉属真菌多存在于发酵酿造样品中, 如食醋、酱油等, 且随着发酵时间有增高的趋势^[29]; 轮枝菌属真菌是一种分布广、适应性强且常见的真菌, 是农业上引起作物黄萎的重要病原菌^[30]; 赤霉菌属真菌分泌赤霉素, 可促进植株快速生长, 有结实率降低、减产等危害; 绿菌门细菌多存在于无氧环境, 为不产氧光合作用的显绿色细菌; 根瘤菌属细菌从植物根毛侵入根内形成根瘤, 并在根瘤内成为分枝的多态细胞, 与植物共生固氮, 对植物生长有良好作用。

《中国药典》2020 年版丹参项下含量测定中的指标成分包括脂溶性成分隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A, 水溶性成分丹酚酸 B; 考虑到中药药效成分

的复杂性, 及“发汗”过程中温湿度变化对化学成分的影响^[13,31-33], 因此增加了“发汗”丹参化学成分中水溶性成分丹参素钠、迷迭香酸、紫草酸作为测定指标, 以期明确微生物群落对药效成分类型的影响。从“发汗”样品属水平上微生物群落丰度与主要药效成分的相关性结果表明, 优势真菌小戴卫霉属与发汗样品中紫草酸含量呈现显著的负相关关系; 子囊菌门未归类霉属与丹参酮 II_A 含量呈现显著的正相关关系。

优势细菌绿菌门未归类菌属与发汗样品中迷迭香酸、水溶性成分含量呈现显著的正相关关系, 相关系数分别为 0.330、0.379; 与丹酚酸 B 含量呈现极显著的正相关关系, 相关系数为 0.434; 与丹参酮 I 含量呈现显著的负相关关系, 相关系数为 0.392。根瘤菌属菌群 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* 与紫草酸含量呈现显著的正相关关系。

综上所述, 本研究初步揭示了中江丹参“发汗”过程中存在的主要微生物群落及变化规律, 证明了优势微生物群落与“发汗”丹参的优良品质存在一定相关性。由于不同加工地点、加工环境及当地气候均会影响丹参中的微生物种群, 后续需对本研究结果进行重复或地点变更的验证实验, 同时进一步对优势微生物进行分离筛选, 探究发汗“发霉”后霉菌对中江丹参药材品质的影响。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 卫莹芳. 中药鉴定学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2010: 25.
[2] 杜伟锋, 丛晓东, 蔡宝昌. 中药产地加工方法“发汗”的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 341-

- 342.
- [3] 周莉江, 刘芳, 季宁平, 等. “发汗”与川产道地药材质量的思考 [J]. 中药与临床, 2015, 6(3): 4-6.
- [4] 陈茹, 陈成, 杨兴鑫, 等. 中药“发汗”炮制法的现代研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 489-493.
- [5] 刘红亮, 晏仁义, 邵爱娟, 等. 中药材“发汗”对药材质量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 349-352.
- [6] 魏担, 吴清华, 刘钰萍, 等. 基于高通量测序研究厚朴“发汗”过程中微生物群落多样性及其特征 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5405-5412.
- [7] 邵长柳, 唐漫群, 刘炳楠, 等. “发汗”对龙脑樟中右旋龙脑和其他成分变化的影响及其 GC-MS 指纹图谱相关性研究 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5580-5589.
- [8] 刘畅, 王潇, 刘芳, 等. 基于多指标质量差异关键属性优化厚朴产地加工“发汗”工艺 [J]. 中草药, 2021, 52(3): 677-684.
- [9] 段金彪, 宿树兰, 严辉, 等. 药材初加工“发汗”过程及其酶促反应与化学转化机制探讨 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1219-1225.
- [10] 洪智慧, 杜伟锋, 杨莹, 等. 基于 UPLC-Triple-TOF/MS 分析续断“发汗”前后化学成分 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1233-1241.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 77.
- [12] 李时珍. 本草纲目 (校点本) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1795: 942.
- [13] 王婷, 于凡, 李国转, 等. “发汗”与非“发汗”丹参中 10 种活性成分含量测定及其质量的主成分分析 [J]. 安徽中医药大学学报, 2019, 38(1): 75-79.
- [14] 于凡, 邱镇, 李国转, 等. 不同发汗条件对发汗丹参中丹参酮类含量的影响 [J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(5): 73-77.
- [15] 邱镇, 于凡, 李国转, 等. 不同环境发汗对发汗丹参有效成分含量及体外抗氧化活性的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(10): 1712-1716.
- [16] 孙婷婷, 赵明, 李亚莉, 等. 普洱茶发酵样品细菌和真菌 DNA 同时提取方法研究 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(15): 249-253.
- [17] 周巍. 现代分子生物学技术食品安全检测应用解析 [M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2018: 17.
- [18] 牛敏, 刘红燕, 刘谦, 等. 4 个栽培年限丹参颜色与 9 种活性成分含量的相关性 [J]. 中成药, 2017, 39(1): 131-135.
- [19] 刘婷婷. 四川黑茶渥堆过程中纤维素酶、果胶酶分泌菌株的筛选及其产酶条件优化 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [20] 杨磊, 程铁轵, 吴树坤, 等. 沉香型白酒酒醅理化特性及细菌群落结构研究 [J]. 中国酿造, 2020, 39(2): 109-114.
- [21] 武亚婷, 杜木英, 何欢欢, 等. 基于高通量测序技术分析新疆不同地区自然发酵辣椒酱微生物群落多样性 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(21): 221-228.
- [22] 周红杰, 李家华, 赵龙飞, 等. 渥堆过程中主要微生物对云南普洱茶品质形成的研究 [J]. 茶叶科学, 2004, 24(3): 212-218.
- [23] 刘亮镜, 潘杨. 中药的发酵炮制初探 [J]. 茶叶科学, 2009, 23(1): 72-76.
- [24] 杨放晴, 何丽英, 杨丹, 等. 不同陈化时间广陈皮表面细菌和真菌多样性变化分析 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(15): 267-275.
- [25] 陈聪聪. 广陈皮陈化过程中微生物群落多样性解析及代谢物成分变化分析 [D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- [26] 杨丹, 徐双美, 熊素琴, 等. 黑曲霉对不同陈化年份广陈皮黄酮类成分的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(1): 492-495.
- [27] 吴晓峰. 发酵对中药巴豆“降毒保效”效应的物质基础研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [28] 陈丽艳, 张迎, 金爽, 等. 黄芩经侧耳菌和黑曲霉发酵后黄酮类成分的变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 63-65.
- [29] 张永杰, 崔宁波, 张丽珍, 等. 基于 DNA 高通量测序分析生料酿醋过程中的真菌多样性 [J]. 微生物学报, 2020, 60(7): 1358-1369.
- [30] 陶杰, 程颖慧, 章桂明, 等. 轮枝菌的检测与鉴定研究进展 [J]. 植物检疫, 2012, 26(6): 64-68.
- [31] 王胜男, 华愉教, 邹立思, 等. 不同“发汗”条件加工玄参中核苷类成分的含量测定及灰色关联度分析 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6): 1027-1036.
- [32] 刘红亮. 从药材性状及化学成分的角度诠释产地初加工“发汗”对厚朴质量的影响 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2013.
- [33] 杜伟锋, 姜东京, 吴瑶, 等. 产地加工“发汗”对续断中异绿原酸 A、异绿原酸 B 及异绿原酸 C 含量的影响 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(5): 842-846.

[责任编辑 郑礼胜]