

卷烟加工及储存过程中细菌群落组成及变化研究

陈兴¹, 杨莹¹, 李珊辉^{2,3}, 张天栋¹, 颜克亮¹, 刘晓敏¹, 肖敏^{2*}, 陈微^{1*} (1. 云南中烟工业有限责任公司技术中心, 云南昆明 650231; 2. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275; 3. 云南大学云南省微生物研究所, 云南昆明 650091)

摘要 [目的]研究卷烟加工及储存过程中细菌群落结构以及多样性的变化。[方法]采用二代高通量测序平台,以云烟(软珍,R)不同制丝工艺的加工工序及储存过程的烟叶表面微生物为研究对象,对其进行16S rRNA 基因高通量测序。[结果]尽管不同制丝工艺在相同加工工序中微生物群落丰富度不尽相同,但主要高丰富度微生物类群的种类比较一致;此外,烟叶在不同城市的不同储存时间下,微生物类群的变化具有类似的趋势。[结论]该研究对从微生物角度改进烟叶制丝工艺具有一定的借鉴意义,同时表明烟叶的储存时间可能是影响微生物后期群落发生变化的主要因素。

关键词 制丝工艺;高通量测序;微生物群落结构;烟叶品质

中图分类号 TS452 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)08-0015-04

Effects of Cigarette Processing and Storage Process on Bacterial Community Structure

CHEN Xing¹, YANG Ying¹, LI Shan-hui^{2,3} et al (1. Technology Center, China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming, Yunnan 650231; 2. School of Life Science, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510275; 3. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091)

Abstract [Objective] In order to study the changes of bacterial community structure and diversity in cigarette processing and storage process [Method] The two generation high-throughput sequencing platforms were used to study the processing technology of Yunyan tobacco (R) and the surface microorganism of tobacco leaves during storage. The 16S rRNA gene was sequenced by high-throughput sequencing. [Result] Although different technics in the same processing in the process of microbial community richness was not the same, but the main types of high richness microbial communities were consistent. In addition, the results also showed that the storage time of tobacco leaves could be the main factor affecting the changing of microbial community rather than the cities where they storage. [Conclusion] The study has a certain reference significance for improving tobacco processing technology from microorganism angle. Meanwhile, it indicates that the storage time of tobacco leaves may be the main factor that affects the later stage of microbial community.

Key words Cigarette processing; High-throughput sequencing; Microbial community structure; Tobacco quality

卷烟是用特定的技术和设备将烟草原料和辅助材料加工制作成消费者可吸食商品的过程。根据烟叶原料的性质,卷烟生产的工艺流程是通过各种加工方法或设备逐步把烟叶原料和其他辅助材料制成合格卷烟产品所必须经过的加工制造过程。该流程包括的主要工艺除制丝外,还包括卷接和包装。有研究表明,烟叶在生长和调制过程中均有微生物在烟叶上生长,其微生物种类和数量会随着烟叶品种、产地、等级、调制方式的不同而存在一定差异。对于烟叶表面微生物群落的研究始于1933年,Reid等^[1]首次发现雪茄烟叶表面具有大量的细菌和霉菌,其主要的细菌类群是巨大芽孢杆菌,而主要的霉菌类群为曲霉和青霉。Tamayo等^[2]从西班牙烟叶中分离出的微生物主要是球菌和芽孢杆菌。谢和等^[3]从烤烟中分离到了放线菌、细菌和霉菌,但未发现酵母菌。邱立友等^[4]的研究发现,烤烟 NC89 在自然醇化过程中烟叶表面存在着占有绝对优势的细菌和数量较少的霉菌和放线菌。王革等^[5]在国内初次从自然发酵的烟叶上分离到酵母菌。研究结果均表明,发酵烟叶表面微生物群落的多样性较丰富,尽管细菌、霉菌和酵母菌等均有存在,但以细菌群落为主,且细菌中的芽孢杆菌所占的丰富度较高。烟叶品质发生复杂变化的主要特征是烟叶中化合物的分解与转化,其

中影响烟叶香气和吸味品质的重要过程是将不具备香味特性的大分子物质,如氨基酸、蛋白质、高级脂肪酸、纤维素、还原性糖和烟碱等化合物,转化为各种挥发性酸或挥发性香气成分的小分子化合物^[6]。此过程中,微生物在烟叶品质和口味的改变过程中发挥着举足轻重的作用。然而,对于烟叶加工及储存运输过程烟叶表面微生物多样性研究较少,这就使得实际工业应用中缺乏科学依据。

笔者通过高通量测序技术,以卷烟加工及储存中的不同过程下的细菌群落为研究对象,对其组成及变化进行研究,以期通过对烤烟烟叶表面微生物进行全面、系统的认知,充分了解烟叶品质变化过程中烤烟烟叶表面微生物群落结构的变化,从而认知微生物群落变化与烟叶品质改变之间的关系,为烟叶品质的调控和微生物资源的挖掘提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 材料及设计 该试验所用到的云烟(软珍,代号 R)卷烟由云南中烟工业有限责任公司提供。根据制丝工艺的不同,分为薄板模块(代号 B)和气流模块(代号 Q),所有样品均来自这2个卷烟制丝工艺的各个加工工序,样品信息如表1所示。

表1中原料烟叶(代号 O1)是指陈化完成后待加工的片状烟叶,片状烟叶经过长时间的陈化过程被挤压成块状,这个时期的烟叶水分含量较少。在松散回潮工序(代号 O2)中,烟叶在加入水蒸气后充分吸收水分而变得松软,然后通过机械的方式把结成块状的烟叶抖散,烟叶充分分散之后开始进入加料工序。制丝过程中加料分2次进行(一加入口,代号 O3;一加入出口,代号 O4;二加入口,代号 O5;二加入出口,代

基金项目 中国烟草总公司科技重点项目(110201402042);云南中烟工业有限责任公司科技项目(2015CP01)。

作者简介 陈兴(1983—),女,重庆人,工程师,博士,从事烟草生物化学研究。*通讯作者:陈微,高级工程师,从事烟草生物化学研究;肖敏,助理研究员,从事微生物资源与开发研究。

收稿日期 2017-10-26; **修回日期** 2017-11-02

号 06), 料液的加入使烟叶的耐加工性能和感官品质提高。储存柜的作用是待加料工序完成后, 烟叶在储柜中储存, 使料液和烟叶充分作用。烟叶从储柜取出后(代号 07), 烟叶经过切丝工序后进入烘丝工序。烘丝完成后(代号 08), 再经过冷却后(代号 09), 最终进入添加香精香料的加香工序。

表 1 不同制丝工艺的烟叶样品信息

Table 1 The information of tobacco samples from different cigarette primary processing

序号 No.	加工工序 Processing procedure	薄板模块 (B) 编号 Sheet module No.	气流模块 (Q) 编号 Airflow module No.
1	原料烟叶	RB01	RQ01
2	松散回潮	RB02	RQ02
3	一加入口	RB03	RQ03
4	一加出口	RB04	RQ04
5	二加入口	RB05	RQ05
6	二加出口	RB06	RQ06
7	储柜出口	RB07	RQ07
8	烘丝后	RB08	RQ08
9	冷却后	RB09	RQ09

研究所用 R 牌号卷烟的储存方式根据城市的不同和放置时间的不同进行取样, 并以刚刚包装成型的卷烟产品作为对照, 具体样品信息如 Rcontrol* (对照), RM01*、RM02*、RM03、RM04、RM05、RW01*、RW02*、RW03、RW04、RW05、RH01、RH02*、RH03、RH04、RH05、RK01、RK02*、RK03、RK04、RK05。样品制备和采集时均带一次性无菌聚乙烯(PE)手套进行操作, 取样完成后, 立即用无菌封口袋包扎密封, 放入 -80 °C 冰箱保存备用。

对于不同城市放置不同时间的未拆封卷烟产品样品分别来自牡丹江市(代号 M)、乌鲁木齐市(代号 W)、海口市(代号 H)和昆明市(代号 K), 在各个城市的放置时间分别为 7 d(代号 01)、30 d(代号 02)、120 d(代号 03)、180 d(代号 04)和 360 d(代号 05), “*”代表样品是由 Roche 454 GS FLX + 平台进行测序, 而其余样品在 Illumina Miseq 平台下测序。

1.2 方法

1.2.1 样品表面微生物的收集及宏基因组 DNA 的提取。参考 2009 年 Zhao 等烟叶表面微生物的收集方法^[7], 根据烟叶的实际状况作了部分改良, 且所有步骤均保证在无菌条件下进行。DNA 的提取采用土壤 DNA 提取试剂盒 (PowerSoil® DNA Isolation kit, code: 12888 - 100) 对收集的各个烟叶表面微生物样品进行 DNA 提取, 提取过程参照试剂盒的操作说明进行了相关优化^[8]。

1.2.2 16S rRNA 基因 PCR 扩增及测序。该研究中, 所有 PCR 扩增引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。对于 Roche 454 GS FLX + 平台测序的样品, 采用融合 barcode 序列的 V6F3 引物 (5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-barcode-TGCAACGCGAAGAACCCTTACC-3') 和 V8R2 引物 (5'-CTATGCGC-CTTGCCAGCCGCTCAGGCCCGGAACGTATTCACCG-3') 进行扩

增。PCR 反应体系包括: 10 × PCR buffer 5.0 μL; dNTP (10 mmol/L each) 0.5 μL; Genomic DNA 10 ng; Bar-PCR primer F (50 μmol/L) 0.5 μL; Primer R (50 μmol/L) 0.5 μL; Plantium Taq (5 U/μL) 0.5 μL; ddH₂O 加至 50.0 μL。

反应条件如下所示: 94 °C、3 min; 94 °C、30 s、45 °C、20 s、65 °C、30 s、5 个循环; 94 °C、20 s、55 °C、20 s、72 °C、30 s、20 个循环; 72 °C、5 min; 10 °C、∞。

对于在 Illumina Miseq 300PE 平台测序的样品, 采用融合 barcode 序列的引物 341F (5'-CCTACACGACGCTCTTC-CGATCTN-barcode-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 和 805R (5'-GACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCAGACTACHVGG-GTATCTAATCC-3')。PCR 反应体系包括: 10 × PCR buffer 5.0 μL; dNTP (10 mmol/L each) 0.5 μL; Genomic DNA 10 ng; Bar-PCR primer F (50 μmol/L) 1.0 μL; Primer R (50 μmol/L) 1.0 μL; Plantium Taq (5 U/μL) 0.5 μL; ddH₂O 加至 50.0 μL。

反应条件如下所示: 94 °C、30 s; 94 °C、20 s、45 °C、20 s、65 °C、60 s、5 个循环; 94 °C、20 s、55 °C、20 s、72 °C、20 s、20 个循环; 72 °C、5 min; 10 °C、∞。

PCR 产物检测后, 采用生工琼脂糖回收试剂盒 (code: SK8131) 对 DNA 进行纯化回收, 由生工生物工程(上海)股份有限公司进行 16S rRNA 基因高通量测序。

1.2.3 数据分析。该研究中 Roche 454 GS FLX + 平台和 Illumina Miseq 300PE 平台测序所得的序列主要通过 QIIME^[9] 软件来进行分析。采用 QIIME 中的 “split_libraries.py” 命令根据 barcode 序列对样品进行区分, 并删除低质量序列: ①序列长度小于 200 或大于 1 000 个碱基; ②序列中存在 6 个及以上的模糊碱基; ③测序时 Q 值的平均值低于 25; ④序列中存在的单碱基重复超过 6 个; ⑤前端的 barcode 序列有 1 个及以上碱基的错配; ⑥引物序列有 1 个及 1 个以上碱基错配。高质量序列通过 uclust^[10] 的方法在 97% 相似度的水平上对所有样品进行 OTU 划分, 并选取代表序列利用 blast^[11] 方法与 Greengenes^[12] 数据库比对, 获得分类学信息。

2 结果与分析

2.1 卷烟加工过程中细菌群落的结构分析

2.1.1 薄板制丝工艺中细菌群落的组成及变化。在云烟(软珍)薄板制丝工艺各加工工序样品(RB01~09)中, 共获得高质量序列 95 603 条, 平均每个样品包含 10 622 条有效序列。所有序列共被注释到了包含 12 个已知的菌门在内的 16 个菌门中(图 1), 其中包括以厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和蓝藻菌门(Cyanobacteria)为主要丰富度的微生物类群, 还包括拟杆菌门(Bacteroidetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)、梭杆菌门(Fusobacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospira)、螺旋体门(Spirochaetes)和疣微菌门(Verrucomicrobia), 此外, 还有 3 个分类地位不明确类群(OD1、OP10 和 TM7)以及未被分类类群(Unclassified bacteria)。在 12 个已知门类的微生物类群中, 厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门

(Actinobacteria) 和蓝藻菌门 (Cyanobacteria) 的平均序列量分别占到云烟 (软珍) 薄板制丝工艺各加工工艺所有样品细菌类群的总注释序列量的 59.2%、24.9%、6.5% 和 8.8%。可见, 厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria) 这 2 个菌门在烟叶处理过程的细菌群落结构组成中为主要优势类群。对比薄板制丝工艺不同阶段的优势菌门相对丰度的变化, 结果表明, 随着薄板制丝工艺加工过程的不同, 细菌群落的组成丰度也显著变化, 变形菌门 (Proteobacteria)、蓝藻菌门 (Cyanobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria) 的相对丰度大体呈现先增加后减少的趋势, 而厚壁菌门 (Firmicutes) 却呈现出先减少后增加的趋势。

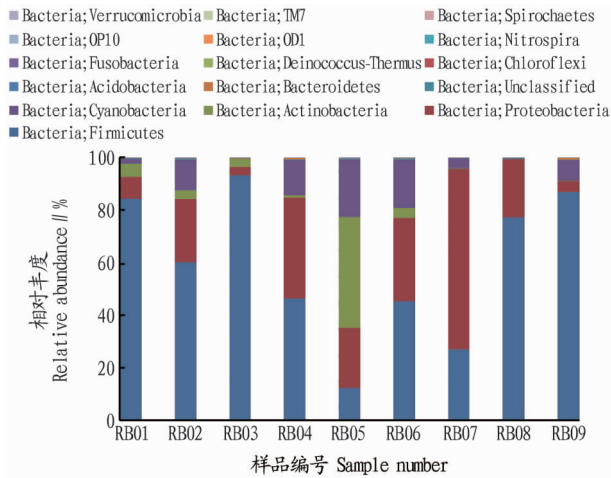


图 1 云烟 (软珍) 薄板制丝工艺各样品在门一级的群落结构

Fig. 1 Community structure at phylum level in thin-plate processing line of Yunyan (ruanzhen)

2.1.2 气流制丝工艺中细菌群落的组成及变化。在云烟 (软珍) 气流制丝工艺各加工工序样品 (RQ01 ~ 09) 中, 共获得高质量序列 113 995 条, 平均每个样品包含 12 666 条有效序列。所有序列共被注释到了包括 21 个已知的菌门中 (图 2), 主要包括优势门类: 变形菌门 (Proteobacteria)、蓝藻菌门 (Cyanobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 以及酸杆菌门 (Acidobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、浮霉菌门 (Planctomyces)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、互养菌门 (Synergistetes)、梭杆菌门 (Fusobacteria)、软壁菌门 (Tenericutes)、衣原体门 (Chlamydiae)、绿菌门 (Chlorobi)、纤维杆菌门 (Fibrobacteres)、黏胶球形菌门 (Lentisphaerae)、硝化螺旋菌门 (Nitrospira)、螺旋体门 (Spirochaetes) 和热袍菌门 (Thermotogae), 此外还有 6 个分类地位不明确类群 (TM7、Bacteria_incertae_sedis、BRC1、OD1、OP10 和 WS3) 和未被分类类群 (Unclassified bacteria)。和薄板制丝工艺类似, 变形菌门 (Proteobacteria)、蓝藻菌门 (Cyanobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria) 为云烟 (软珍) 气流制丝工艺各加工工序样品中的主要优势菌群, 分别占总序列数的 46.2%、32.3%、9.9% 和 8.4%; 此外, 气流制丝工艺中拟杆菌门 (Bacteroidetes) 占总序列量的 1.1%。

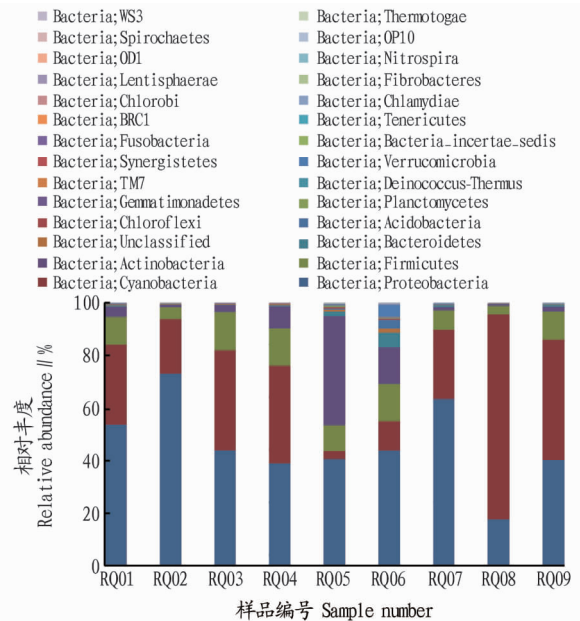


图 2 云烟 (软珍) 气流制丝工艺各样品在门一级的群落结构

Fig. 2 Community structure at phylum level in air-flow processing line of Yunyan (ruanzhen)

2.2 不同放置形式下的烟叶表面微生物结构分析 在不同城市放置不同时间下的云烟 (软珍) 产品 (Rcontrol、RM01、RM02、RM03、RM04、RM05、RW01、RW02、RW03、RW04、RW05、RH01、RH02、RH03、RH04、RH05、RK01、RK02、RK03、RK04、RK05) 在门一级水平上, 所有序列共被注释到了 24 个门, 其中包括以厚壁菌门 (Firmicutes)、蓝藻菌门 (Cyanobacteria) 和变形菌门 (Proteobacteria) 为主的优势菌门, 还包括拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、嗜热丝菌门 (Caldiserica)、衣原体门 (Chlamydiae)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、脱铁杆菌门 (Deferribacteres)、异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus)、纤维杆菌门 (Fibrobacteres)、梭杆菌门 (Fusobacteria)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 等。此外, 还有 4 个分类地位不明确类群 (OD1、OP10、TM7 和 Bacteria_incertae_sedis) 和未被分类类群 (Unclassified bacteria)。具体物种相对丰度如图 3 所示。

3 结论与讨论

高通量测序技术是目前微生物多样性研究应用最为广泛高效的方法^[13]。该研究采用高通量测序技术对不同制丝工艺的卷烟及其运输过程中烟叶表面微生物多样性进行研究, 每个样品平均获得 12 842 条高质量序列, 划分为 21 个已知门类。对不同制丝工艺及不同运输过程烟叶表面微生物群落的研究均表明, 包括变形菌门 (Proteobacteria)、蓝藻菌门 (Cyanobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes), 以及放线菌门 (Actinobacteria) 在内的类群为主要微生物门类。已有研究表明, 发酵烟叶表面微生物多样性较为丰富, 且以细菌为主, 其中芽孢杆菌类群较为丰富, 这与该研究所得宏基因组数据分析结果相一致。韩锦峰等^[14]研究表明, 叶面微生物数量会随着人工发酵和自然醇化而逐渐减少。雷丽萍等^[15]对烟叶生长和晾制阶段细菌种群的动态变化进行了系统研究, 发现白

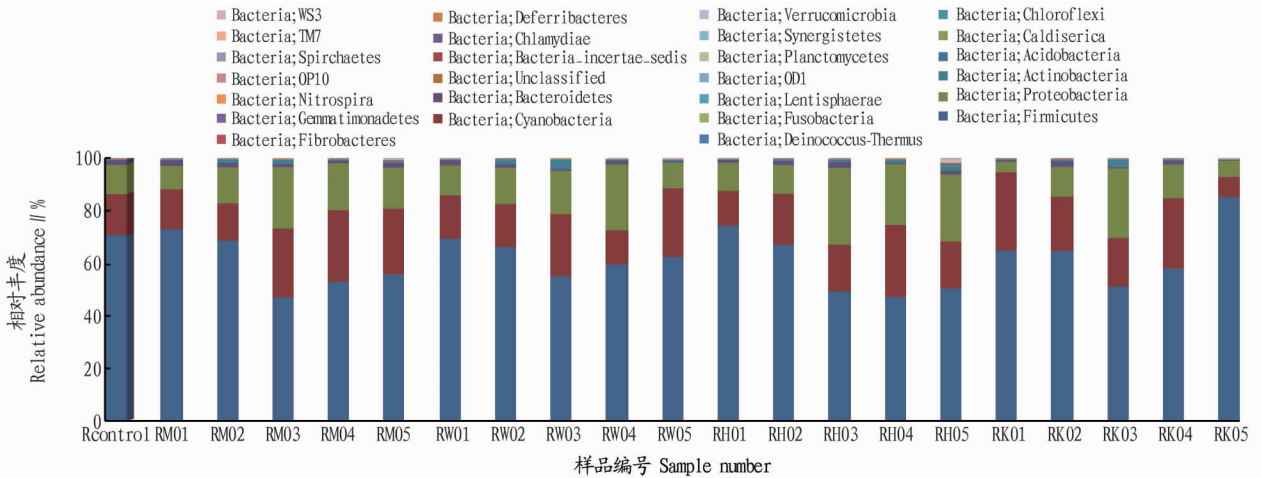


图3 不同城市不同放置时间下的云烟(软珍)产品在门一级的群落结构

Fig.3 Community structure at phylum level in Yunyan(ruanzhen) product stored at different time in different cities

肋烟在晾晒过程中,烟叶干燥速度和相对湿度与细菌总量的变化密切相关。该研究表明,随着加工工艺的改变和储存地域及时间的变化,烟叶表面微生物的类群和丰度不断发生变化,但主要类群的种类相对稳定。制丝工艺作为卷烟生产过程中至关重要一环,对其表面微生物群落研究表明,云烟(软珍)卷烟在薄板和制丝工艺下,各加工工序中烟叶表面细菌类群的变化具体表现为:不同的制丝工艺中优势菌群的相对丰度有明显差异,主要原因可能与原料烟叶的品质不同有关,也充分说明了烟草烟叶表面微生物的数量和种类随烟叶品种、产地、等级及加工方式的不同而存在一定差异^[14-17]。在同一制丝工艺下,随着加工工序的不断进行,优势类群的相对丰度也在逐渐发生变化,这可能是不同加工工序的处理导致了外界环境因子(如温度和湿度等)的不断变化,从而影响了烟叶表面细菌的生理机能,而不同的微生物类群具有不同的生理适应性,因此产生了细菌优势类群数量和种类上的变化,也可能是外界物质进入后直接与细菌类群发生作用而影响其群落结构;不同制丝工艺的相同加工工序中优势菌群相对丰度同样具有明显差异,可能因为薄板和气流2种不同的制丝工艺的处理在影响着烟叶表面的群落结构,也可能因为原料烟叶自身所携带的细菌类群的种类和数量就不同,因此导致了这种差异的形成。尽管2种制丝工艺中微生物群落的变化没有明显趋势,但在二加入口的样品(RB05和RQ05)中,放线菌类群丰度均明显增多,这可能是由于随着松散回潮之后,微生物与外界空气接触充足,消耗烟叶中的糖类、纤维素、半纤维素、蛋白质等大分子有机物质,使得环境中的营养物质极度下降,而对环境适应能力较强的放线菌丰度显著升高。在这个过程中,蛋白质的消耗可以有效减少因蛋白质含量过多而产生的恶臭味^[18];糖类物质转化为醇类、脂类、单萜类等小分子化合物可以产生一定香气^[19-23];纤维素的减少可以有效减少烟叶的辛辣和刺激性^[24]。因此,在此过程中很有可能是微生物影响烟叶品质(包括口感和气味)的重要环节。根据不同城市放置时间的烟叶表面微生物研究表明,除昆明之外,不同城市的烟叶在放置7d后,

微生物类群与对照的变化基本不大,且随着时间的变化,不同城市放置的烟叶表面主要微生物群落丰度的变化大体一直,也就是说,相对于时间因素来讲,空间地理因素可能不是影响烟叶微生物主要类群丰度变化的主要原因。烟叶品质的改变,可能随放置的时间不同而逐渐改变。

总之,该研究通过高通量测序技术解析了烟叶在不同制丝工艺加工及储存过程中微生物群落结构的变化,发现在一加出口和二加入口的过程中可能是与烟叶品质相关的重要阶段,为微生物制剂指导烟叶加工工艺提供理论借鉴。此外,研究还表明,在储存过程中,烟叶的储存时间可能是影响烟叶表面微生物群落变化的主要因素,而其所在地理位置环境对烟叶的影响不大。

参考文献

- [1] REID J J, MCKINSTRY D W, HALEY E E. Studies on the fermentation of tobacco I: Microflora of cured and fermenting cigar-leaf tobacco[J]. Pennsylvania agricultural experiment station bulletin, 1933, 356: 1-17.
- [2] TAMAYO A I, CANCHO F G. Microbiology of the fermentation of Spanish tobacco[J]. International congress of microbiology, 1953, 6: 48-50.
- [3] 谢和, 韩忠礼, 赵维娜. 微生物发酵对烤烟内在品质的影响[J]. 山地农业生物学报, 1999, 18(4): 227-330.
- [4] 邱立友, 赵铭清, 岳雪梅. 自然发酵烤烟叶面微生物区系的分离鉴定[J]. 烟草科技, 2000, 33(3): 14-17.
- [5] 王革, 马永凯, 王颖琦, 等. 自然发酵烟叶的优势有益菌群分析[J]. 云南烟草, 2003, 74(2): 27-30.
- [6] 朱大恒, 韩锦峰, 张爱萍, 等. 自然醇化与人工发酵对烤烟化学成分变化的影响比较研究[J]. 烟草科技, 1999, 32(1): 3-5.
- [7] 赵铭钦, 刘云, 李芳芳, 等. 陈化烤烟叶面优势菌的筛选鉴定与其增香效应[J]. 生态和环境微生物, 2009, 49(5): 624-630.
- [8] 李珊辉. 卷烟加工及储存过程中微生物群落结构与其品质关系的研究[D]. 昆明: 云南大学, 2015.
- [9] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [10] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [11] ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool[J]. Journal of molecular biology, 1990, 215(3): 403-410.
- [12] DESANTIS T Z, HUGENHOLTZ P, LARSEN N, et al. Greengenes: Chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench-compatible in ARB[J]. Applied & environmental microbiology, 2006, 72(7): 5069-5072.
- [13] SZCZEPANOWSKI R, BEKEL T, GOESMANN A, et al. Insight into the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to antimicrobial drugs analysed by the 454-pyrosequencing technology[J]. Journal of biotechnology, 2008, 136(1/2): 54-64.

(下转第45页)

- 理生化第三次学术研讨会论文摘要汇编. 北京: 中国畜牧兽医学, 2004: 2.
- [28] 刘丽, 韦建福, 傅伟龙, 等. GSH 对离体培养鸡小肠上皮细胞增殖和一部分性能的影响 [C] // 中国畜牧兽医学动物生理化学分会, 中国畜牧兽医学动物营养分会, 中国畜牧兽医学养牛学分会. 动物生理生化分会第八次学术会议暨全国反刍动物营养生理生化第三次学术研讨会论文摘要汇编. 北京: 中国畜牧兽医学, 2004: 1.
- [29] 刘丽, 韦建福, 傅伟龙, 等. 还原型谷胱甘肽对肉鸡生长及血清 IGF-1 水平、组织 IGF-1 mRNA 表达的影响 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28(8): 982-986.
- [30] 宋增廷, 姜宁, 等. 爱忠, 等. 谷胱甘肽对肉羊生长性能、屠宰性能及肉品质的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(11): 14-17.
- [31] 姜宁, 张爱忠, 宋增廷, 等. 谷胱甘肽对育肥羊生长性能及生长激素/胰岛素样生长因子-1 轴调控作用的研究 [J]. 动物营养学报, 2009, 21(3): 312-318.
- [32] 董桂芳, 朱晓鸣, 杨云霞, 等. 黄颡鱼饲料中添加谷胱甘肽降低藻毒素毒性作用的研究 [J]. 水生生物学报, 2010, 34(4): 722-730.
- [33] 王琳, 梁旭方, 陈晓艳, 等. 饲料添加剂硒和谷胱甘肽对微囊藻毒素胁迫下罗非鱼肝脏去毒相关基因诱导表达的影响 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2010, 31(1): 95-99.
- [34] 张甬元, 徐立红, 周炳升, 等. 鱼体中谷胱甘肽对微囊藻毒素的解毒作用的初步研究 [J]. 水生生物学报, 1996, 20(3): 284-286.
- [35] 苏荣胜, 闫文龙, 潘家强, 等. 谷胱甘肽对铜孵育的肉鸡肝细胞线粒体的保护作用 [J]. 中国兽医学报, 2012, 32(4): 602-605.
- [36] 刘致珊, 胡建民, 孙宝贵, 等. 鸡谷胱甘肽水平与抗病力的相关性研究 [J]. 辽宁畜牧兽医, 1994(2): 11-13.
- [37] GADEA J, SELLES E, MARCO M A, et al. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation; Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders [J]. Theriogenology, 2004, 62(3/4): 690-701.
- [38] 朱林炜. GSH 和 SOD 对猪精液常温保存效果的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [39] 李博玲, 马恒东, 王贞, 褪黑素、谷胱甘肽对猪精液冷冻保存效果的影响 [J]. 四川畜牧兽医, 2011, 38(7): 26-28.
- [40] 唐淑红, 林嘉鹏, 吴阳升, 等. 谷胱甘肽 (GSH) 对绵羊细管冻精质量的影响 [J]. 江西农业学报, 2015, 27(5): 79-83.
- [41] SINHA M P, SINHA A K, SINGH B K, et al. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen [J]. Animal reproduction science, 1996, 41(3/4): 237-243.
- [42] 张文举, 杨军祥, 黄金成, 等. 谷胱甘肽提高牛冻精活力及受胎率的研究 [J]. 甘肃畜牧兽医, 1997(2): 13-14.
- [43] 魏红芳, 张长兴, 咎林森, 等. 谷胱甘肽 (GSH) 对牛卵母细胞体外受精胚胎发育的影响 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(33): 16398, 16404.
- [44] DE MATOS D G, FURNUS C C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine [J]. Theriogenology, 2000, 53(3): 761-771.
- [45] SURENDRA P, NAWALAGATTI C M, CHETTI M B, et al. Effect of plant growth regulators and micronutrients on morpho-physiological and biochemical traits and yield in okra [J]. Karnataka journal of agricultural sciences, 2010, 19(3): 191-196.
- [46] 韩刚, 党青, 赵忠. 干旱胁迫下沙生灌木花棒的抗氧化保护响应研究 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(5): 1007-1013.
- [47] 马玉华, 马锋旺, 马小卫, 等. 干旱胁迫对苹果叶片抗坏血酸含量及其代谢相关酶活性的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(3): 150-154, 160.
- [48] 高吉霞, 龚春梅, 刘西平. 水分胁迫对刺槐叶和根谷胱甘肽抗氧化系统的影响 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(7): 1409-1414.
- [49] 韩刚, 党青, 赵忠. 柠条抗氧化保护系统对干旱胁迫的响应 [J]. 草地学报, 2010, 18(4): 528-532.
- [50] KUSVURAN S. Influence of drought stress on growth, ion accumulation and antioxidative enzymes in okra genotypes [J]. Int J Agric Biol, 2012, 14(3): 401-406.
- [51] 闫志强, 刘隗, 吴小业, 等. 温度对五种沉水植物生长和营养去除效果的影响 [J]. 生态科学, 2014, 33(5): 839-844.
- [52] KOCSY G, PÁL M, SOLTÉSZ A, et al. Low temperature and oxidative stress in cereals [J]. Acta agronomica hungarica, 2011, 59(2): 169-189.
- [53] DING S H, LEI M, LU Q T, et al. Enhanced sensitivity and characterization of photosystem II in transgenic tobacco plants with decreased chloroplast glutathione reductase under chilling stress [J]. Biochimica et biophysica acta (BBA)-Bioenergetics, 2012, 1817(11): 1979-1991.
- [54] 鹿宁. 高温胁迫下龙须菜抗氧化系统的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [55] 陈大清, 王健. 高温胁迫下谷胱甘肽对离体玉米叶片的保护效应 [J]. 湖北农学院学报, 1997, 17(4): 254-256.
- [56] 马敏, 龚惠红, 邓泓. 重金属对 8 种园林植物种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. 中国农业通报, 2012, 28(22): 206-211.
- [57] GRILL E, LÖFFLER S, WINNACKER E L, et al. Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase) [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 1989, 86(18): 6838-6842.
- [58] 陈玉胜. 外源谷胱甘肽对水稻种子萌发过程中铜毒害的缓解效应 [J]. 南京晓庄学院学报, 2007(6): 66-69.
- [59] 陈玉胜. 外源谷胱甘肽对大豆种子萌发过程中铜毒害的缓解效应 [J]. 大豆科学, 2012, 31(2): 247-251.
- [60] XIANG C B, WERNER B L, CHRISTENSEN E M, et al. The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels [J]. Plant physiology, 2001, 126(2): 564-574.
- [61] 罗映虹, 张一扬, 刘晓颖, 等. 外源抗坏血酸与谷胱甘肽对打顶后烟草氧化还原平衡及烟碱的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2016, 24(3): 356-364.

(上接第 18 页)

- [14] 韩锦峰, 朱大恒, 刘卫群, 等. 陈化发酵期间烤烟叶面微生物活性及其应用研究 [J]. 中国烟草科学, 1997, 18(4): 13-14.
- [15] 雷丽萍, BUSH L, COYNE M S, 等. 烟叶生长和晾制期间细菌种群动态变化——烟草微生物细菌调控技术研究之一 [J]. 中国烟草科学, 2001, 22(3): 4-6.
- [16] 厉昆坤. 自然陈化过程中烤烟叶面微生物变化及应用研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [17] 王芳, 赖泳红, 米静, 等. 不同陈化烟叶叶面高温微生物多样性 [J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(3): 471-476.
- [18] 罗家基, 朱子高, 罗毅, 等. 微生物在烟叶发酵过程中的作用 [J]. 烟草科技, 1998, 31(1): 61.
- [19] KOSUGE T, KAMIYA H. Discovery of a pyrazine in a natural product: Tetramethylpyrazine from cultures of a strain of *Bacillus subtilis* [J]. Nature, 1962, 193: 776.
- [20] DEMAIN A L, JACKSON M, TRENNER N R. Thiamine-dependent accumulation of tetramethylpyrazine accompanying mutation in the isoleucine-valine pathway [J]. Bacteriol, 1967, 94: 323-326.
- [21] SHARPELL F H J. Comprehensive biotechnology [M]. Toronto: Pergamon Press, 1985: 965-981.
- [22] 孙爱东, 葛毅强, 张欣, 等. 水果制品增香技术研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 1998, 25(1): 44-49.
- [23] 朱大恒, 韩锦峰, 周御风, 等. 利用产香微生物发酵生产烟用香料技术及其应用 [J]. 烟草科技, 1997, 30(1): 30-31.
- [24] 周元清, 周丽清, 赵雪冰, 等. 微生物对烟叶品质改善作用的研究 [J]. 玉溪师范学院学报, 2006, 22(9): 88-90.

本刊提示 参考文献只列主要的、公开发表的文献, 序号按文中出现先后编排。著录格式(含标点)如下: (1) 期刊——作者(不超过 3 人者全部写出, 超过者只写前 3 位, 后加“等”)。文章题名 [J]. 期刊名, 年份, 卷(期): 起止页码。(2) 图书——编著者. 书名 [M]. 版次(第一版不写)。出版地: 出版者, 出版年: 起止页码。(3) 论文集——析出文献作者. 题名 [C] // 主编. 论文集名. 出版地: 出版者, 出版年: 起止页码。