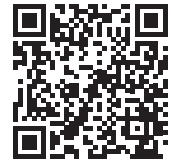


10种中药饮片污染微生物群落特征研究

蓝福胜, 吴燕燕, 林玉双, 郑域茹, 高丹玲



福建省食品药品质量检验研究院 (福州 350001)

【摘要】目的 考察 10 种中药饮片微生物污染水平, 并对其污染的真菌和耐热菌开展多样性研究。**方法** 根据《中国药典 (2020 年版)》微生物限度检查方法, 检测饮片的需氧菌总数 (TAMC)、霉菌和酵母菌总数 (TYMC)、耐热菌总数 (THRC) 和 3 种控制菌, 基于内转录间隔区 (ITS) 和 16S 核糖体 DNA (16SrDNA) 高通量测序技术研究饮片污染真菌和耐热菌的群落特征。**结果** 28% (14/50) TAMC 大于 10^6 cfu/g, 20% (10/50) TYMC 大于 10^4 cfu/g, 68% (34/50) THRC 大于 10 cfu/g, 40% (20/50) 检出耐胆盐革兰阴性菌, 2 批广藿香检出大肠埃希菌, 所有饮片均未检出沙门氏菌。高通量测序结果显示饮片污染真菌分布于 12 门、777 属、1 467 种, 耐热菌分布于 5 门、57 属、74 种; 饮片中含有黄曲霉菌以及解淀粉芽孢杆菌、缓慢葡萄球菌和沃氏葡萄球菌等耐热性致病菌。**结论** 这 10 种中药饮片普遍受微生物污染, 部分饮片含有产毒真菌和致病性耐热菌, 患者用药具有潜在的微生物致病风险。

【关键词】 中药饮片; 微生物污染; 控制菌检查; 真菌; 耐热菌; 高通量测序; 菌种鉴定; 黄曲霉菌; 解淀粉芽孢杆菌; 缓慢葡萄球菌; 沃氏葡萄球菌

【中图分类号】 R286.0 **【文献标识码】** A

Community characteristics of contaminated microorganisms in 10 kinds of Chinese herbal pieces

LAN Fusheng, WU Yanyan, LIN Yushuang, ZHENG Yuru, GAO Danling

Fujian Institute for Food and Drug Quality Control, Fuzhou 350001, China

Corresponding author: GAO Danling, Email: gaodanling@fjifdc.org.cn

【Abstract】Objective To evaluate the microbial contamination levels of 10 kinds of Chinese herbal pieces, and explore the diversity of fungi and heat-resistant bacteria. **Methods** The total aerobic microbial count (TAMC), total yeast and mould count (TYMC), total heat-resistant microbial count (THRC) and 3 types control bacteria were detected according to the microbial limit inspection method of Chinese Pharmacopoeia 2020. Besides, the community characteristics of contaminated fungi and heat-resistant bacteria on prepared slices were analysed based on internal transcribed spacer (ITS) and 16S ribosomal DNA (16SrDNA) high-throughput sequencing method. **Results** The TAMC of 28% (14/50) samples exceeded 10^6 cfu/g, the TYMC of 20% (10/50) samples exceeded 10^4 cfu/g, the THRC of 68% (34/50) samples were higher than 10 cfu/g, and the bile-tolerant gram-negative bacteria were detected in 40% (20/50) of the samples. *Escherichia coli* were found in 2 batches of the Pogostemon cablin, but Salmonella was

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202404114

基金项目: 福建省药品监督管理局省抽探索性研究项目 (闽药监综科便函 [2023] 31 号)

通信作者: 高丹玲, 主任技师, Email: gaodanling@fjifdc.org.cn

not found in any sample. High throughput sequencing results showed that the fungi contaminated distributed in 12 phylums, 777 genera and 1 467 species; the heat-resistant bacteria were mainly distributed in 5 phylums, 57 genera and 74 species. The decoction pieces contained *Aspergillus flavus* and heat-resistant pathogens such as *Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus lentus*, and *Staphylococcus warneri*. **Conclusion** The 10 kinds of decoction pieces are generally contaminated by microorganisms, and some of them contain toxic fungi and pathogenic heat-resistant bacteria, which poses a potential risk of microbial pathogenicity for patients.

【Keywords】 Chinese herbal pieces; Microbial contamination; Control bacteria test; Fungi; Heat-resistant bacteria; High-throughput sequencing; Species identification; *Aspergillus flavus*; *Bacillus amyloliquefaciens*; *Staphylococcus lentus*; *Staphylococcus warneri*

中药饮片的原料主要来源于动物、植物和矿物，除自身携带大量微生物难以通过简单炮制完全清除外，在采收、加工、运输和贮藏等过程中还可能再次被微生物侵染^[1]。目前，国家尚未制定煎煮类饮片的微生物限度标准，因此该类饮片的质量监管存在薄弱环节，极易使生产企业忽视微生物污染的控制。杨美琴等^[2]研究发现，相比可直接服用也可煎煮、直接服用和外用 3 类饮片，煎煮类饮片的微生物负载最高，研究发现一些煎煮类饮片含有致病性耐热菌^[3-11]。有学者采用高通量测序技术，发现龟甲饮片表面真菌主要是曲霉属和青霉属，柴胡、黄芪、枸杞子、铁皮枫斗、桔梗和土鳖虫污染细菌主要为变形菌门和厚壁菌门，白术、麦冬、金银花等 9 种中药饮片污染细菌优势菌属包括肠杆菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属等^[12-14]。

中药饮片尤其是果实种子类饮片富含油脂和淀粉等成分，为微生物生长繁殖提供了营养条件^[15]。饮片中细菌和霉菌一旦发生增殖，不仅降低饮片的药效^[16]，更为严重的是可能导致真菌毒素累积^[17]及耐热菌增多^[18]，增加患者微生物感染和中毒风险。清肺排毒汤、寒湿疫方及化湿败毒方等中药汤剂在治疗新型冠状病毒感染具有一定功效^[19]，受到老年患者青睐，而老年人因免疫力较低，若服用微生物污染严重饮片，易加重病情。为探究其中的微生物污染情况，本研究采用《中国药典》方法和高通量测序技术对上述方剂中的广藿香、苦杏仁、连翘等 10 种煎煮类饮片开展微生物群落特征分析，以期为新型冠状病毒乃至流感病毒患者安全用药提供一定的指导，也为开展煎煮类饮片的微生物控制提供数据支持。

1 材料

1.1 主要仪器

BSA2201 型电子天平（德国 Sartorius）；HVA110 型高压蒸汽灭菌器（日本 HIRAYAMA）；BSC1600-II-A2 型生物安全柜（山东新华医疗器械股份有限公司）；PURA22 型恒温水浴锅（德国 JULABO）；IPP410 型恒温培养箱（德国 MEMMERT）；Ci-S 型显微镜（日本 Nikon）；VITEK2 Compact 30 型全自动微生物鉴定系统（法国生物梅里埃）；Pico-21 型台式离心机（美国 Thermo Fisher）；ETC811 型 PCR 仪（北京东胜创新生物科技有限公司）；DYCZ-21 型琼脂糖凝胶电泳仪（北京市六一仪器厂）；FR-1000 型凝胶成像系统（上海复日科技有限公司）；Illumina Miseq 核酸测序平台和生工云分析平台。

1.2 主要药品与试剂

pH 7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液（批号：210922）、胰酪大豆胨琼脂（trypticase soy agar, TSA）培养基（批号：220517）、胰酪大豆胨液体（tryptic soy broth, TSB）培养基（批号：220914）、孟加拉红琼脂（rose bengal agar, RBA）培养基（批号：211216）、肠道菌增菌（enterobacteriaceae enrichment, EE）肉汤（批号：210927）、紫红胆盐葡萄糖琼脂（violet red bile glucose agar, VRBGA）培养基（批号：210624）、麦康凯液体（MacConkey broth, MacB）培养基（批号：221021）、麦康凯琼脂（MacConkey agar, MacA）培养基（批号：220321）、沙门氏菌增菌肉汤（rappaport vassiliadis salmonella enrichment broth, RVSEB, RV）培养基（批号：211123）、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐（xylose

lysine desoxycholate, XLD) 琼脂培养基 (批号: 220927)、三糖铁 (triple sugar iron, TSI) 琼脂培养基 (批号: 151117) 均购于北京三药科技开发有限公司。E.Z.N.A.[®] Mag-Bind[®] DNA 提取试剂盒 (美国 Omega, 批号: M5635-02); Qubit[®] dsDNA HS 定量试剂盒 (美国 Thermo Fisher, 批号: Q32854); 2 × Hieff[®] Robust PCR 预混合溶液 (批号: 10105ES03) 和 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (批号: 12601ES56) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司。

五味子、紫苏子、连翘等 10 种 50 批饮片分别购自福建省内零售药店, 经福建省食品药品质量检验研究院中药与天然药物检验所刘岩庭主管

药师鉴定, 结果符合《中国药典 (2020 年版)》一部及四部规定。具体见表 1。

1.3 标准菌株

大肠埃希菌 [*Escherichia coli*, 菌号: CMCC (B)44102]、乙型副伤寒沙门氏菌 [*Salmonella paratyphi* B, 菌号: CMCC(B) 50094]、铜绿假单胞菌 [*Pseudomonas aeruginosa*, 菌号: CMCC(B) 10104]、枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis*, 菌号: CMCC(B) 63501]、金黄色葡萄球菌 [*Staphylococcus aureus*, 菌号: CMCC(B) 26003]、白色念珠菌 [*Candida albicans*, 菌号: CMCC(F) 98001]、黑曲霉 [*Aspergillus niger*, 菌号: CMCC(F) 98003] 均购自中国食品药品检定研究院医学微生物菌种保藏中心。

表1 饮片信息

Table 1. Information of decoction pieces

类别	品名	编号	产地	批号
果实种子类	五味子	Sch-1~7	辽宁、辽宁、吉林、辽宁、辽宁、辽宁、辽宁	230301、A230820、202104001-1、211201085210901、220701、230703
	紫苏子	Per-1~4	湖北、黑龙江、吉林、河北	230301、230301、2212013042、22032601
	连翘	For-1~4	山西、山西、山西、山西	230301、221201、221226、220901
	百合	Lil-1~4	浙江、湖南、湖南、湖南	23040101、230301、230530、A211023
	苦杏仁	Arm-1~3	内蒙古、河北、河北	230106、22102801、230501
	蔓荆子	Fru-1~3	江西、江西、江西	22080113046、202304038、1706003
全草类	苍耳子	Sib-1~3	黑龙江、内蒙古、湖北	2212013031、230501、1802001
	广藿香	Pog-1~9	广东、广东、广东、广东、广东、广东、广东、广西、广东	202207001-3、211101、221220、221102、B22122202-01、Z2201001、2112210072、230201、22082208
根茎类	板蓝根	Isa-1~8	安徽、安徽、河北、河北、甘肃、甘肃、安徽、河北	221228、22091703、202012001-7、22042014、220101、20210701、20210924、202012001-6
发酵类	淡豆豉	Fer-1~5	河北、河北、河北、黑龙江、河北	230315、36923006、2105002、20230601、444221002

2 方法与结果

2.1 微生物限度检测方法的建立

2.1.1 菌液的制备

按照《中国药典 (2020 年版)》四部“1105 非无菌产品微生物限度检查: 微生物计数法”和“1106 非无菌产品微生物限度检查: 控制菌检查法”^[20]的要求, 将方法适用性试验用菌株制成浓度 ≤ 100 cfu/mL 的菌悬液。

2.1.2 供试液的制备

称取饮片 25 g 至无菌有隔均质袋中, 加入 225 mL 的 pH 7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液, 拍击混匀 1 min, 制成 1 : 10 供试液。取适量 1 : 10 供试液转移至无菌试管中, 置沸水浴 30 min 后快速冷却, 作为耐热菌总数 (total heat-resistant microbial count, THRC) 计数用供试液。

2.1.3 方法适用性试验

取“2.1.2”项下 THRC 计数用供试液, 按常规法进行微生物计数和控制菌检查方法适用性试验。结果表明需氧菌总数 (total aerobic microbial count, TAMC)、霉菌和酵母菌总数 (total yeast and mould count, TYMC)、THRC 可采取 10^{-1} ~ 10^{-6} 的梯度稀释液按倾注法进行检测; 耐胆盐革兰阴性菌 (bile-tolerant gram-negative bacteria, BGB) 的含量检测可采取 10^{-1} ~ 10^{-5} 的梯度稀释液 1 mL, 然后接种 10 mL EE, 再根据 VRBGA 平板上的菌落生长情况, 结合 MPN (most probable number) 表确定; 大肠埃希菌检测所需 TSB 培养基的用量均为 100 mL; 检测沙门氏菌时, 除五味子的 TSB 培养基用量为 500 mL 外, 其余均为 200 mL。

2.2 数据处理

饮片污染微生物的定量检测结果以 lg 值表

示, TAMC、THRC 及 TYMC 的 lg 值为 0.5, 表示计数结果 <10 cfu/g; BGB 可能菌数 (N) 的 lg 值为 0.5 表示 $N < 10$ cfu/g、1.5 表示 $10 < N < 10^2$ cfu/g、2.5 表示 $10^2 < N < 10^3$ cfu/g、3.5 表示 $10^3 < N < 10^4$ cfu/g, 以此类推。

2.3 微生物限度检测

2.3.1 微生物计数

按“2.1.3”项下方法对饮片污染微生物的载量进行分析, 所有的饮片 lgTAMC > 1.0, 28% (14/50) 的饮片 lgTAMC > 6.0, lgTAMC 均值 5.0, 最大值

7.9, 果实种子类饮片 lgTAMC 均值 4.5, 在 4 类饮片中最低。74% (37/50) 的饮片 lgTYMC > 1.0, 20% (10/50) 的饮片 lgTYMC > 4.0, lgTYMC 均值 2.5, 最大值 5.6, 果实种子类饮片 lgTYMC 均值 2.4, 低于全草类但高于发酵类和根茎类。沸水浴 30 min 后, 68% (34/50) 的饮片 lgTHRC > 1.0, 20% (10/50) 的饮片 lgTHRC > 3.0, lgTHRC 均值 1.9, 最大值 7.7。热处理使样品中的 TAMC 平均下降 63.2%, 其中淡豆豉的 TAMC 仅下降 19.9%, 表明该饮片具有较大的耐热菌负载 (表 2)。

表2 中药饮片微生物计数结果分布表

Table 2. Distribution of microbial counting results in Chinese herbal pieces

样品	lgTAMC			lgTYMC			lgTHRC		
	分布范围	平均值	中位数	分布范围	平均值	中位数	分布范围	平均值	中位数
五味子	1.00~4.66	3.62	3.90	0.50~2.18	0.91	0.50	0.50~0.50	0.50	0.50
紫苏子	3.18~4.43	4.06	4.32	0.50~3.54	2.32	2.62	0.50~1.78	1.11	1.08
连翘	3.00~6.38	4.75	4.82	0.50~3.52	1.98	2.01	2.43~3.40	3.07	3.23
百合	3.15~6.70	4.44	3.95	0.50~4.15	2.57	2.82	1.00~3.08	1.78	1.53
苦杏仁	3.32~4.40	3.82	3.74	2.00~3.45	2.50	2.00	0.50~1.00	0.67	0.50
蔓荆子	4.95~6.04	5.39	5.18	0.50~4.85	2.82	3.11	1.90~2.30	2.15	2.26
苍耳子	4.48~6.25	5.27	5.08	0.50~4.43	2.86	3.66	1.00~4.40	2.31	1.54
广藿香	5.36~7.84	6.59	6.52	3.46~5.64	4.50	4.71	0.50~5.26	2.25	1.98
板蓝根	3.85~6.52	4.70	4.53	0.50~5.52	2.20	1.89	0.50~1.70	0.91	0.75
淡豆豉	4.04~7.90	6.23	6.69	0.50~3.99	1.58	1.18	2.74~7.66	4.99	3.74

2.3.2 控制菌

按“2.1.3”项下方法对饮片进行控制菌检查, 40% (20/50) 的饮片检出 BGB, 24% (12/50) 的饮片 lgBGB > 3.5。广藿香 lgBGB 为 0.5~4.5, 中位数为 3.5, BGB 污染水平高于其他 9 种饮片。经 VITEK 生化系统鉴定, 广藿香污染 BGB 主要包括以下 6 类: 泛菌属菌种、气味沙雷菌、阪崎克罗诺杆菌、肺炎克雷伯菌、成团泛菌和致伤埃希菌。广藿香 (Pog-9) 在沸水浴 15 min 后仍可

检出 BGB, 鉴定为泛菌属菌种。2 批广藿香检出大肠埃希菌, 所有样品均未检出沙门氏菌。

2.4 沸水浴时间对耐热菌活性的影响

对 lgTHRC 较大的苍耳子 (Sib-3)、广藿香 (Pog-9) 和淡豆豉 (Fer1-5), 按 0、15、30、45、60、90、120 min 沸水浴处理后, 测定 TAMC。由表 3 可知, 即使增加沸水浴时间至 120 min, 饮片污染的耐热菌也可能保持活性, 如淡豆豉 (Fer-5), 其 lg 值高达 7.6。

表3 不同沸水浴时间的TAMC测定结果

Table 3. Results of the TAMC in different boiling bath time

时间 (min)	Sib-3	Pog-9	Fer-1	Fer-2	Fer-3	Fer-4	Fer-5
0	6.56	7.98	7.17	7.65	7.66	4.68	7.64
15	4.60	6.18	5.44	6.30	7.47	3.57	7.61
30	3.79	5.00	3.34	5.99	7.32	3.51	7.67
45	3.36	4.56	3.14	5.25	5.47	3.51	7.63
60	2.69	3.00	2.77	2.95	5.30	3.46	7.59
90	1.47	2.67	<1	<1	3.90	3.38	7.63
120	<1	<1	<1	<1	1.47	2.65	7.60

2.5 饮片污染真菌的高通量测序

2.5.1 内转录间隔区扩增子测序与分析

选择 10 种共 24 批受霉菌污染较严重 ($\lg\text{TYMC}>2.0$) 的饮片, 按“2.1.2”项下方法制备成 1:10 供试液, 采用 E.Z.N.A.[®] Mag-Bind[®] 真菌 DNA 提取试剂盒提取上述供试液中的真菌 DNA 作为测序模板。采用引物内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 1 F5'-CTTGATCATTAGAGGAAGTAA-3'和 ITS2 5'-GCTGCGTTCATCGATGC-3'对 ITS 的 ITS1~ITS2 区进行 PCR 扩增。经 2% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收样本条带清晰的样品, 基于 Illumina MiSeq 系统进行测序。使用 USEARCH 软件将有效序列聚类为相似度 $\geq 97\%$

的操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU), 选择丰度最高的序列作为每个 OTU 的代表序列与数据库比对, 进行物种注释, 并在各个分类水平上分析物种组成、丰度信息和多样性。Shannon 值越大, 群落多样性越高; Simpson 值越小, 群落多样性越低。

2.5.2 OTU 聚类

测序结果显示, 有效序列数量范围 $10^4\sim 10^5$, 序列长度主要分布在 200~300 bp, 平均长度为 232 bp。苦杏仁获得最多有效序列 (109 334 条), 板蓝根获得最少有效序列 (76 717 条)。所有样品共产生 4 822 个 OTUs, 其中广藿香的 OTUs 最多 (874 个), 其次是苦杏仁 (805 个), 百合的 OTUs 最少 (136 个)。具体见表 4。

表4 10种中药饮片高通量测序数据分析

Table 4. High-throughput sequencing data analysis in ten Chinese herbal pieces

样品	测序批数	有效序列	OTUs	Chao1指数	Ace指数	Shannon指数	Simpson指数	覆盖范围
广藿香	5	94345	874	483.48	494.55	2.51	0.19	1.00
苦杏仁	2	109334	805	610.94	607.67	3.60	0.07	1.00
淡豆豉	3	98311	674	350.04	348.80	2.10	0.25	1.00
五味子	2	98403	560	376.15	380.01	2.59	0.20	1.00
紫苏子	2	87934	440	279.52	289.21	2.04	0.25	1.00
蔓荆子	2	95314	426	289.35	292.41	2.38	0.19	1.00
连翘	2	91372	336	246.28	254.78	1.31	0.48	1.00
板蓝根	2	76717	299	221.34	225.35	1.34	0.57	1.00
苍耳子	2	91129	272	252.17	255.44	2.25	0.17	1.00
百合	2	86478	136	132.91	141.99	1.60	0.31	1.00

2.5.3 真菌群落组成

24 批饮片污染真菌分布于 12 门、45 纲、126 目、344 科、777 属和 1 467 种, 以子囊菌门和担子菌门为主 (表 5)。相对丰度超过 1% 的真菌属有 53 个, 苦杏仁 (18 个)、淡豆豉 (12 个)、五味子 (11 个)、苍耳子 (11 个)、紫苏子 (10 个)、广藿香 (8 个)、板蓝根 (6 个)、蔓荆子 (5 个)、连翘 (3 个)、百合 (3 个)。由图 1 可知, 这 10 种饮片污染真菌的种类多样,

不同品种间具有很大差异。同一品种的不同批次之间, 仅百合、蔓荆子、苍耳子和广藿香这 4 种饮片污染真菌的种类较为相似, 其中: 百合以交链孢霉属和镰刀菌属为主, 苍耳子和广藿香以曲霉菌属和节担菌属为主, 蔓荆子以曲霉属为主。91.6% (22/24) 的样品检测到黄曲霉, 其中以蔓荆子污染黄曲霉的相对丰度最大, Fru-1 和 Fru-2 分别高达 22.12% 和 40.29%。

表5 样品中真菌的相对丰度情况

Table 5. Relative abundance of fungi in the samples

分类	学名	广藿香	苦杏仁	淡豆豉	五味子	紫苏子	蔓荆子	连翘	板蓝根	苍耳子	百合
门	子囊菌门	65.58	75.72	68.93	54.89	64.88	92.49	73.69	66.41	60.54	19.91
	担子菌门	27.26	23.77	27.03	31.28	14.82	3.55	25.24	30.22	11.14	80.08
	毛霉门	<1.00	<1.00	2.39	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	未分类真菌	7.13	0.44	1.59	13.80	20.20	3.73	<1.00	3.31	28.30	<1.00
	其他	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00

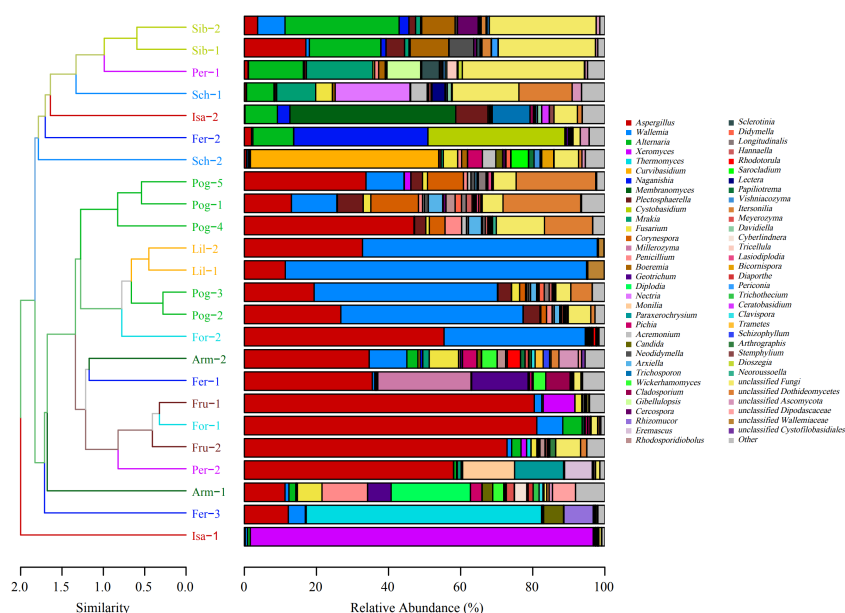


图1 真菌属水平相对丰度的统计分析

Figure 1. Statistical analysis of relative abundance at genus level in fungi

2.6 饮片污染耐热菌的高通量测序

2.6.1 16S核糖体DNA扩增子测序与分析

取“2.1.2”项下制备的1:10供试液10 mL, 置沸水浴30 min, 然后吸取1 mL接种100 mL的TSB培养基, 30~35 °C培养48 h, 收集培养液。采用E.Z.N.A.® Mag-Bind® 细菌DNA提取试剂盒, 提取培养液中耐热菌的DNA作为测序模板。采用引物515 F5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'和909R 5'-CCCGYCAATTCMTTTRAGT-3'对

16S rDNA的V4~V5区进行PCR扩增, 其余方法同“2.5.1”项。

2.6.2 OTU聚类

除五味子外, 其余9种共43批饮片均获得有效序列, 有效序列数量范围 $10^4 \sim 10^5$, 序列长度为350~500 bp。苦杏仁获得最多有效序列(80 897条), 所有饮片的OTUs在45~60之间。具体见表6。

表6 9种中药饮片高通量测序数据分析

Table 6. High-throughput sequencing data analysis in nine Chinese herbal pieces

样品	测序批数	有效序列	OTUs	Chao1指数	Ace指数	Shannon指数	Simpson指数	覆盖范围
板蓝根	8	62235	60	60.00	61.94	0.62	0.79	1.00
淡豆豉	5	70723	55	65.62	67.78	0.85	0.65	1.00
百合	4	69744	55	61.60	70.24	0.46	0.85	1.00
苦杏仁	3	80897	54	58.50	61.61	0.45	0.85	1.00
紫苏子	4	67761	53	55.50	56.54	0.67	0.77	1.00
蔓荆子	3	66487	53	58.60	59.42	0.69	0.77	1.00
苍耳子	3	66066	53	68.60	79.31	0.98	0.52	1.00
连翘	4	59044	47	91.00	65.64	0.52	0.83	1.00
广藿香	9	77738	46	55.61	57.86	0.74	0.69	1.00

2.6.3 耐热菌群落组成

43批饮片污染耐热菌分布于5门、9纲、24目、34科、57属和74种。在门水平, 耐热菌由厚壁菌门、放线菌门、变形菌门、蓝藻门和拟杆菌门组成, 其中厚壁菌门占99%以上; 在科水平, 优势菌为芽孢杆菌科和硫酸素芽孢杆菌科; 在属

水平, 优势菌为芽孢杆菌属和硫酸素芽孢杆菌属。具体见表7。

2.7 耐热菌鉴定

从样品的THRC测定平板中分离到32个耐热菌典型菌落, 生化鉴定结果见表8, 约91%(29/32)为芽孢杆菌, 约9%(3/32)为葡萄球菌。

表7 样品中耐热菌相对丰度情况

Table 7. Relative abundance of heat-resistant microbial in the samples

分类	学名	板蓝根	淡豆豉	百合	苦杏仁	紫苏子	蔓荆子	连翘	苍耳子	广藿香
门	厚壁菌门	99.77	99.75	99.73	99.80	99.71	99.79	99.71	99.79	99.81
	其他	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
科	芽孢杆菌科	95.31	96.73	80.54	95.35	95.43	94.31	96.45	92.88	94.75
	硫酸素芽孢杆菌科	1.76	1.28	15.87	1.56	1.61	4.09	1.45	1.29	1.86
	梭菌科	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	2.47	<1.00
	动球菌科	<1.00	<1.00	1.37	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	其他	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
属	芽孢杆菌属	95.02	96.39	80.19	95.12	95.14	94.09	96.14	92.47	94.49
	硫酸素芽孢杆菌属	1.76	1.29	15.88	1.56	1.61	4.10	1.46	1.30	1.86
	梭菌属	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	2.47	<1.00
	耐盐耐热菌属	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	1.60	<1.00
	未分类芽孢杆菌科	1.71	<1.00	<1.00	1.45	1.05	<1.00	1.05	<1.00	2.12
	未分类动球菌科	<1.00	<1.00	1.37	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	其他	<1.00	<1.00	1.15	1.12	<1.00	<1.00	<1.00	1.09	<1.00

表8 中药饮片污染耐热菌菌种鉴定结果

Table 8. Identification results of heat resistant bacteria in Chinese herbal pieces

样品	属	种	致病性	
板蓝根	芽孢杆菌属	解淀粉芽孢杆菌	条件致病菌	
		枯草芽孢杆菌	益生菌	
		地衣芽孢杆菌	益生菌	
紫苏子	脂环酸芽孢杆菌属	酸土脂环酸芽孢杆菌	非致病菌	
	葡萄球菌属	沃氏葡萄球菌	条件致病菌	
	葡萄球菌属	缓慢葡萄球菌	条件致病菌	
连翘/百合/淡豆豉	芽孢杆菌属	芽孢杆菌属	地衣芽孢杆菌	益生菌
		芽孢杆菌属	解淀粉芽孢杆菌	条件致病菌
蔓荆子	芽孢杆菌属	解淀粉芽孢杆菌	条件致病菌	
		枯草芽孢杆菌	益生菌	
		地衣芽孢杆菌	益生菌	
苦杏仁/苍耳子	芽孢杆菌属	地衣芽孢杆菌	益生菌	
广藿香	芽孢杆菌属	解淀粉芽孢杆菌	条件致病菌	
		枯草芽孢杆菌	益生菌	
		嗜热淀粉芽孢杆菌	非致病菌	
		地衣芽孢杆菌	益生菌	
	短芽孢杆菌属	克劳氏芽孢杆菌	非致病菌	
		短芽孢杆菌属	桥石短芽孢杆菌	非致病菌
		葡萄球菌属	沃氏葡萄球菌	条件致病菌

3 讨论

研究结果表明：除五味子外，其余9种饮片普遍具有较高的微生物负载，对比国外标准发现，受试样品有44% (22/50) 不符合 USP^[21] 规定，8% (8/50) 不符合 EP^[22] 和 JP^[23] 规定，其中广藿香（全草类）和淡豆豉（发酵类）不符合规定的占比高

于其他饮片。五味子 TAMC 和 TYMC 低于总体平均值近 2 个数量级，这可能与五味子呈弱酸性（溶液 PH 值为 3.15）有关。通过模拟饮片的煎煮过程，检测汤汁中的 TAMC，除五味子外，其余 9 种饮片均检测到耐热菌，尤其是淡豆豉的耐热菌含量明显高于其他饮片，且不易通过煎煮杀灭。高通量测序和平板分离鉴定结果均显示饮片污染耐热

菌^[24]主要为芽孢杆菌属细菌,除解淀粉芽孢杆菌有报道为条件致病菌外,其余均为非致病菌。此外从 THRC 检测平板中分离到少量的沃氏葡萄球菌^[25]和缓慢葡萄球菌^[26]等条件致病菌。3 种控制菌(BGB、大肠埃希菌和沙门氏菌),BGB 的检出率最高。广藿香煎煮 15 min 后,仍能检测到 BGB,说明该类菌虽然不耐热,但也可能存活于后下类饮片的汤汁中。这 10 种饮片污染真菌的种类各异,但在多数样品中可检测到黄曲霉,且黄曲霉是蔓荆子中的优势菌。综上,广藿香和淡豆豉的微生物污染最为严重,蔓荆子可能容易污染黄曲霉毒素,老年患者尽量选择不含上述 3 种饮片的方剂,以降低用药风险。

3.1 对煎煮类饮片微生物质量控制的建议

虽然煎煮类饮片污染微生物,经煎煮后多数被杀灭,但污染的耐热菌不易通过煎煮过程杀灭。目前,USP^[21]、EP^[22]和 JP^[23]根据饮片用途分直接服用和煎煮两大类,并制订了相应的微生物限度标准。我国煎煮类饮片微生物标准的缺失,意味着管理体系的不完善。在当前国家大力推进中医药传承创新的背景下,中药材规模化、规范化种植有加速形成趋势,国家有必要适时出台煎煮类饮片的微生物标准,特别是对饮片中的耐热菌总量和 BGB 含量进行控制,以引导饮片生产企业逐步形成生产全过程卫生质量控制意识,从而整体提升我国饮片的质量水平。

3.2 对耐热菌检测方法的建议

在 THRC 的检测方法上,由于后下类饮片如广藿香的煎煮时间较短(一般 15 min),若按《中国药典》规定的沸水浴 30 min 后测定其 THRC,不能真实反应该类饮片的耐热菌污染风险。因此,在检测后下类饮片的 THRC 时,建议将供试液置水浴(98~100 ℃)处理的时间参照饮片的实际煎煮时间。

3.3 对饮片生产企业的建议

芽孢杆菌是中药饮片污染耐热菌的主要微生物,耐干旱和高温,不仅在饮片中可以长期存活,而且还可在冷藏条件下的饮片汤汁中及人体内重新转变成营养细胞并迅速繁殖,威胁患者的用药安全。特别是炭疽芽孢杆菌^[27-28]和蜡样芽孢杆菌^[29-30]能引起人类或动物严重致病,虽然这 10 种饮片未检测到上述 2 种致病菌,但有研究在通草^[31]和海螵蛸^[32]中发现蜡样芽孢杆菌,加上一

些非致病的芽孢杆菌也可能成为条件致病菌,因此饮片中的芽孢杆菌污染需引起重视。据报道,⁶⁰Co-γ 射线具有较强的穿透力,是一种经济、高效的灭菌方式,已证实其对芽孢杆菌具有较好的杀灭能力,且对多数中药饮片的成分和含量影响较小^[33]。因此,生产企业除适度加强饮片的净制处理外,对于全草类等不易通过净制手段降低微生物负载的饮片,可以尝试采用⁶⁰Co 辐照灭菌。此外,要特别重视饮片储存条件的管控,预防饮片在储藏环节发生微生物繁殖和毒素累积。

参考文献

- 1 李辉,杨美琴,杨晓莉,等. 中药饮片微生物污染研究热点及标准探讨[J]. 中药材, 2021, 44(1): 224-228. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2021.01.043.
- 2 杨美琴,胡昌勤,刘鹏,等. 中药饮片微生物污染量调查分析[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(20): 1671-1676. [Yang MQ, Hu CQ, Liu P, et al. Research and analysis about microbial quantity contamination of prepared slices of Chinese crude drugs[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2021, 56(20): 1671-1676.] DOI: 10.11669/cpj.2021.20.009.
- 3 杨昊,周爽,杨戈,等. 市售 11 种煎煮类中药饮片微生物污染情况考察[J]. 药学研究, 2023, 42(5): 321-325. [Yang H, Zhou S, Yang G, et al. Investigation of microbial contamination for 11 kinds of traditional Chinese medicine decoction pieces for sale[J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2023, 42(5): 321-325.] DOI: 10.13506/j.cnki.jpr.2023.05.006.
- 4 张煜琳,李哲,周芸,等. 10 种庆阳产中药饮片微生物污染状况调研[J]. 化工管理, 2023, (11): 40-44. [Zhang YL, Li Z, Zhou Y, et al. Investigation on microbial contamination of 10 traditional Chinese medicine pieces produced in Qingyang[J]. Chemical Enterprise Management, 2023, (11): 40-44.] DOI: 10.19900/j.cnki.ISSN1008-4800.2023.11.011.
- 5 孙莺,郭晓鹏,徐勤科,等. 基于高通量测序的 6 种甘肃道地药材中药饮片污染微生物群落特征研究[J]. 中国药学杂志, 2023, 58(24): 2282-2293. [Sun Y, Guo XP, Xu QK, et al. Community characteristics of contaminated microorganisms in six kinds of Gansu authentic Chinese herbal pieces based on high-throughput sequencing[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2023, 58(24): 2282-

- 2293.] DOI: [10.11669/cpj.2023.24.014](https://doi.org/10.11669/cpj.2023.24.014).
- 6 张光华, 王似锦, 江志杰, 等. 北京地区销售的 10 种中药饮片微生物污染程度考察 [J]. 中国药房, 2018, 29(14): 1940–1944. [Zhang GH, Wang SJ, Jiang ZJ, et al. Investigation of microbial contamination for 10 kinds of TCM decoction pieces in Beijing area[J]. China Pharmacy, 2018, 29(14): 1940–1944.] DOI: [10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.16](https://doi.org/10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.16).
 - 7 杨晓莉, 李辉, 绳金房. 12 种中药饮片耐热菌污染状况调查及风险评估 [J]. 陕西中医, 2016, 37(6): 740–743. [Yang XL, Li H, Sheng JF. 12 kinds of Chinese herbal medicine thermoduric bacteria contamination investigation and risk assessment[J]. Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 37(6): 740–743.] DOI: [10.3969/j.issn.1000-7369.2016.06.045](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-7369.2016.06.045).
 - 8 宋铁蛋, 陈艳菲, 李璐. 中药饮片紫苏子和钩藤的耐热菌考察 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(10): 1229–1231. [Song TD, Chen YF, Li L. Investigation of thermoduric bacteria in Chinese herbal medicine: *Uncaria rhynchophylla* and *Perilla frutescens*[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2019, 36(10): 1229–1231.] DOI: [10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.10.011](https://doi.org/10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.10.011).
 - 9 李珏, 郑小玲, 梁法勇, 等. 中药饮片麦冬和芫花中耐热菌的考察 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 642–644. [Li J, Zheng XL, Liang FY, et al. Investigation of thermoduric bacteria in Chinese herbal medicine: *Ophiopogonis radix* and *Genkwa flos*[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2016, 33(5): 642–644.] DOI: [10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.030](https://doi.org/10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.030).
 - 10 张学博, 郁爱萍, 陆春胜. 中药饮片耐热微生物研究 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(11): 56–60. [Zhang XB, Yu AP, Lu CS. Researches of heat resistant microorganisms in Chinese herbal pieces[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2021, 17(11): 56–60.] DOI: [10.11954/ytetyy.202111015](https://doi.org/10.11954/ytetyy.202111015).
 - 11 于志君, 李腊梅, 刘婧, 等. 基于 16S rRNA 序列分析的动物饮片典型菌污染特征研究 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43(10): 1737–1750. [Yu ZJ, Li LM, Liu J, et al. Characterization of typical bacteria isolation from animal decoction spieces based on 16S rRNA sequence analysis[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2023, 43(10): 1737–1750.] DOI: [10.16155/j.0254-1793.2023.10.12](https://doi.org/10.16155/j.0254-1793.2023.10.12).
 - 12 张帆, 李红霞, 徐清, 等. 基于高通量测序法及平板法研究龟甲饮片表面真菌种类及其多样性 [J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(1): 63–68. [Zhang F, Li HX, Xu Q, et al. Species and diversity of fungi on surface of tortoiseshell decocting pieces:a study based on high-throughput sequencing and plate method[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 42(1): 63–68.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-2157.2019.01.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-2157.2019.01.012).
 - 13 李琼琼, 范一灵, 宋明辉, 等. 基于高通量测序的 6 类中药饮片污染微生物群落特征分析 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(11): 1945–1953. [Li QQ, Fan YL, Song MH, et al. Microbial community composition analysis of six Chinese herbal pieces through 16S rRNA high-throughput sequencing[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 39(11): 1945–1953.] DOI: [10.16155/j.0254-1793.2019.11.04](https://doi.org/10.16155/j.0254-1793.2019.11.04).
 - 14 陈柯, 陈敏, 林黎, 等. 基于 16S rRNA 高通量测序分析 9 种中药饮片污染微生物群落特征 [J]. 中医药导报, 2022, 28(9): 53–56, 61. [Chen K, Chen M, Lin L, et al. Analysis of microbial community characteristics in 9 kinds of Chinese herbal pieces based on 16S rRNA high throughput sequencing[J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, 2022, 28(9): 53–56, 61.] DOI: [10.13862/j.cn43-1446/r.2022.09.009](https://doi.org/10.13862/j.cn43-1446/r.2022.09.009).
 - 15 郑润生. 中药材污染真菌毒素的液质联用高通量检测研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbname=CMFD201501&filename=1014360461.nh>.
 - 16 杨瑞琦. 基于电子鼻的易霉变中药质量快速评价 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbname=CMFD201902&filename=1019153459.nh>.
 - 17 汪杨, 王嫣, 杨雅婷, 等. 甘草饮片中微生物及真菌毒素污染状况考察 [J]. 中国药师, 2021, 24(11): 2114–2117. [Wang Y, Wang Y, Yang YT, et al. Study on contamination of microorganism and mycotoxin in *Glycyrrhiza* decoction pieces[J]. China Pharmacist, 2021, 24(11): 2114–2117.] DOI: [10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2021.11.033](https://doi.org/10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2021.11.033).
 - 18 宋琳, 白秀秀, 李辉. 中药饮片耐胆盐革兰阴性菌量化风险评估研究 [J]. 中国药业, 2023, 32(20): 86–90. [Song L, Bai XX, Li H. Quantitative risk assessment of bile salt-resistant gram-negative bacteria in traditional Chinese medicine decoction pieces[J]. China

- Pharmaceuticals, 2023, 32(20): 86–90.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-4931.2023.20.019](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-4931.2023.20.019).
- 19 刘晓凤, 刘睿鹏, 廖丹, 等. 中医药对新型冠状病毒感染后咳嗽的治疗作用[J]. 国外医药(抗生素分册), 2023, 44(4): 230–235. [Liu XF, Liu RP, Liao D, et al. The therapeutic effect of traditional Chinese medicine on cough after novel coronavirus infection[J]. World Notes on Antibiotics, 2023, 44(4): 230–235.] DOI: [10.13461/j.cnki.wna.005556](https://doi.org/10.13461/j.cnki.wna.005556).
- 20 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 170–171.
- 21 USP-NF2023[S]. 2023: 2245–2259.
- 22 EP11.0[S]. 2022: 201–209, 638.
- 23 JP18[S]. 2021: 138–147, 2486–2489.
- 24 黄虎翔, 王辉, 张万明. 解淀粉芽孢杆菌对婴幼儿潜在致病性的研究[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(2): 190–192. [Huang HX, Wang H, Zhang WM. Potential pathogenicity of *Bacillus amyloliquefaciens* to infants[J]. Journal of Clinical Pediatrics, 2010, 28(2): 190–192.] DOI: [10.3969/j.issn.1000-3606.2010.02.024](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-3606.2010.02.024).
- 25 丁雨涵, 杨江华. 沃氏葡萄球菌致人工瓣膜心内膜炎 1 例[J]. 牡丹江医学院学报, 2023, 44(1): 121–123. DOI: [10.13799/j.cnki.mdjyxyxb.2023.01.037](https://doi.org/10.13799/j.cnki.mdjyxyxb.2023.01.037).
- 26 张树凤. 286 株凝固酶阴性葡萄球菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(6): 1347–1348. [Zhang SF. Analysis of clinical distribution and drug-resistance of 286 strains of coagulase negative *Staphylococcus*[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2009, 19(6): 1347–1348.] DOI: [CNKI:SUN:ZWJZ.0.2009-06-057](https://doi.org/CNKI:SUN:ZWJZ.0.2009-06-057).
- 27 梁娴婷. 常见职业病的致病机制和防控措施概述[J]. 生物学教学, 2019, 44(12): 2–3. DOI: [10.3969/j.issn.1004-7549.2019.12.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-7549.2019.12.001).
- 28 王桂花, 马忠锋. 山东省阳信县 2 例炭疽病例的调查分析[J]. 疾病预防控制通报, 2023, 38(2): 71–73, 96. DOI: [10.13215/j.cnki.jbyfkztb.2209008](https://doi.org/10.13215/j.cnki.jbyfkztb.2209008).
- 29 王一玮, 戎禾辰, 郭忠红, 等. 苏州地区蜡样芽孢杆菌感染 31 例临床特征分析[J]. 国外医药(抗生素分册), 2023, 44(2): 141–145. [Wang YW, Rong HC, Guo ZH, et al. Clinical characteristics of 31 cases of *Bacillus cereus* infection in Suzhou city[J]. World Notes on Antibiotics, 2023, 44(2): 141–145.] DOI: [10.13461/j.cnki.wna.005533](https://doi.org/10.13461/j.cnki.wna.005533).
- 30 张玲. 一起由巴氏杀菌乳污染引起的多名幼儿食源性疾病爆发事件的流行病学分析[J]. 食品安全导刊, 2022, (35): 94–97. [Zhang L. Epidemiological analysis of an outbreak of foodborne diseases in children caused by Pasteurized milk pollution[J]. China Food Safety Magazine, 2022, (35): 94–97.] DOI: [10.16043/j.cnki.cfs.2022.35.032](https://doi.org/10.16043/j.cnki.cfs.2022.35.032).
- 31 甘永琦, 农浚, 樊兰艳, 等. 中药饮片耐热菌微生物类群的分析[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2274–2281. [Gan YQ, Nong J, Fan LY, et al. Analysis of microbial community of heat resistant microorganisms in Chinese herbal pieces[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(11): 2274–2281.] DOI: [10.19540/j.cnki.cjcm.20180322.009](https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20180322.009).
- 32 田妮娜, 白雯静, 张彩霞, 等. 甘肃地区海螵蛸饮片的微生物污染状况考察[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(22): 2777–2779. [Tian NN, Bai WJ, Zhang CX, et al. Study on the microbial contamination status of Cuttlebone in Gansu[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2020, 30(22): 2777–2779.] DOI: [CNKI:SUN:ZWJZ.0.2020-22-029](https://doi.org/CNKI:SUN:ZWJZ.0.2020-22-029).
- 33 韦瑀龙, 蓝晓庆. 中药钴 60 辐照灭菌的应用研究进展[J]. 海峡药学, 2019, 31(8): 4–7. [Wei YL, Lan XQ. Progress in application research of ⁶⁰Co irradiation sterilization on traditional Chinese medicine[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2019, 31(8): 4–7.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-3765.2019.08.002](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-3765.2019.08.002).

收稿日期: 2024 年 04 月 19 日 修回日期: 2024 年 06 月 06 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳