

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

李琼琼, 范一灵, 宋明辉, 秦峰, 杨美成*

(上海市食品药品检验所, 国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 上海 201203)

摘要 目的: 研究 6 类中药饮片中污染微生物的群落特征, 为中药饮片微生物限度标准制定提供依据。方法: 参照《中华人民共和国药典》2015 年版, 对 6 类中药饮片共 60 批样品进行耐胆盐革兰阴性菌和沙门菌检查, 采用 VITEK 生化鉴定系统对选择性分离平板上的微生物菌落进行鉴定, 并基于 16S rRNA 高通量测序方法研究中药饮片中污染微生物的群落特征。结果: 共有 28 批样品检出耐胆盐革兰阴性菌, 不同类别饮片中耐胆盐革兰阴性菌的检出率差异较大, 而沙门菌均未检出; 菌株生化鉴定结果表明, 6 类中药饮片中污染的微生物均属于变形菌门, 分布于 14 个属, 其中包含阪崎克罗诺杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、奇异变形杆菌、鲍氏不动杆菌等致病菌或条件致病菌; 16S rRNA 高通量测序微生物多样性分析结果表明, 中药饮片污染微生物主要分布于 6 个门、27 个属, 不同类别中药饮片中的优势菌属具有明显差异。结论: 16S rRNA 高通量测序方法比传统培养法能够获得更加全面的中药饮片中污染微生物群落信息, 不同类别中药饮片中污染微生物群落的组成具有一定差异, 多种致病菌的检出提示中药饮片污染微生物具有一定的致病风险。

关键词: 中药饮片; 微生物污染; 控制菌检查; 菌种鉴定; 16S rRNA 高通量测序

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)11-1945-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.11.04

Microbial community composition analysis of six Chinese herbal pieces through 16S rRNA high-throughput sequencing

LI Qiong-qiong, FAN Yi-ling, SONG Ming-hui, QIN Feng, YANG Mei-cheng*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Testing Technology of Pharmaceutical Microbiology, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To study the microbial community composition of six Chinese herbal pieces, and provide support for the establishment of microbial limit standards. **Methods:** According to the Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2015 edition, a total of 60 batches Chinese herbal pieces were tested for bile-tolerant Gram-negative bacteria and *Salmonella*, the microbial colonies on selective isolation medium were identified by VITEK system, and the microbial community composition of six Chinese herbal pieces were further studied based on 16S rRNA high-throughput sequencing method. **Results:** A total of 28 batches were positive for bile-tolerant Gram-

* 通信作者 Tel:(021)50610592; E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

第一作者 Tel:(021)50808719; E-mail: lqq1986228@126.com

negative bacteria, the detection rates of bile-tolerant Gram-negative bacteria in different types of Chinese herbal pieces showed significant difference, but *Salmonella* was not detected in any samples. The results of biochemical identification of strains on selective isolation medium demonstrated that the microbes all belong to the *Proteobacteria*, distributed in 14 genera, including *Enterobacter sakazakii*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*; 16S rRNA microbial diversity analysis showed that the contaminated microorganisms of six Chinese herbal pieces were mainly distributed in 6 phylum and 27 genera, and the dominant group in different types had significant differences. **Conclusion:** This study revealed that 16S rRNA high-throughput sequencing method can provide more comprehensive information on the microbial community composition of Chinese herbal pieces than the traditional culture method. The contaminated microbial communities in different types of Chinese herbal pieces show significant differences, and various pathogenic bacteria are detected in Chinese herbal pieces, implying the potential risk of contaminated microorganisms in Chinese herbal pieces.

Keywords: Chinese herbal pieces; microbial contamination; control microorganisms; species identification; 16S rRNA high-throughput sequencing

中药饮片系指药材经过炮制后可直接用于中医临床或制剂生产使用的处方药品^[1],中药饮片来源十分广泛,包括天然植物、动物和矿物。作为中医药的重要特色和优势之一,中药饮片的质量优劣直接关系到中医医疗效果以及中药制剂的安全有效。中药饮片在原料来源和炮制加工过程中往往含有大量微生物,微生物不仅会影响其储存和质量稳定,严重的微生物污染尤其是致病微生物,还可引发用药安全问题^[2-3]。因此,制定科学合理的中药饮片微生物限度标准,是保证饮片微生物安全的关键,也是实现中药标准引领国际、中药产业健康发展的关键^[4]。目前,欧洲药典、美国药典和日本药局方均收录了天然药(生药)的微生物检查方法和限度标准。《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2015年版四部通则“1107非无菌药品微生物限度标准”亦首次收录了中药饮片的微生物限度标准,但仅针对研粉口服用贵细饮片、直接口服及泡服饮片。《中国药典》2020年版拟新增“中药饮片微生物限度检查法”,并拟对饮片的微生物限度标准进行修订,已公示的“中药饮片微生物限度标准(草案)”基于饮片的给药途径和潜在风险,分级制定了微生物限度标准。

目前,各国药典对于天然药均规定了基于传统培养的微生物限度检查方法。我国的多位学者采用传统培养方法对多种中药饮片的微生物污染情况进行了研究^[5-9]。但是,传统培养技术往往只能获

得1%左右甚至更低比例的可培养微生物^[7],对于全面了解中药饮片污染微生物的多样性及群落构成是远远不够的。随着高通量测序技术的发展成熟和低成本化,其已成为当前研究环境微生物多样性及群落结构差异的重要技术手段^[10]。因此,本研究以6类中药饮片为研究对象,采用16S rRNA高通量测序技术对中药饮片污染的微生物类群进行研究,同时基于《中国药典》2015年版的规定对待测饮片进行控制菌检查,以期进一步了解中药饮片微生物污染的实际情况和致病风险,为中药饮片微生物限度标准的完善及微生物污染的控制提供支持和依据。

1 材料

1.1 主要仪器

Miseq 核酸测序仪(Illumina公司);Qubit 3.0 荧光定量仪(赛默飞公司);ABI 9700型PCR扩增仪(ABI公司);VITEK 2 Compact全自动微生物生化鉴定系统(BioMerieux公司);琼脂糖凝胶电泳仪及成像系统(BioRad公司);LABGARD型生物安全柜(NuAire公司)。

1.2 主要试剂

Nextera DNA Flex文库制备试剂盒(Illumina公司);MiSeq Reagent Kit v3(2×300 cycle)测序试剂盒(Illumina公司);dsDNA HS Assay Kit for Qubit(Invitrogen公司);细菌基因组DNA小量纯化试剂盒、Premix Taq™ DNA聚合酶试剂盒(TAKARA,大

连宝生物工程有限公司)。

2 实验方法

2.1 中药饮片样品的采集

本研究选取柴胡、黄芪、枸杞子、铁皮枫斗、桔梗、土鳖虫共计 6 个中药饮片品种,每个品种 10 个批次。对于每个品种,尽可能选择不同的生产单位,以便研究数据具有更好的代表性。共收集中药饮片样品 60 批,具体信息见表 1。

表 1 中药饮片样品信息

Tab. 1 Sampling information for the tested

Chinese herbal pieces				
样品 (sample)	部位 (part)	炮制工艺 (processing technology) ^[1,11]	生产单位	
			数量 (number of production company)	数量/批 (number/ batch)
柴胡 (<i>Bupleuri Radix</i>)	根 (root)	净制,切片,干燥 (net, sliced, dried)	6	10
黄芪 (<i>Astragali Radix</i>)	根 (root)	净制,切片,干燥 (net, sliced, dried)	9	10
枸杞子 (<i>Lycii Fructus</i>)	果实 (fruit)	去除杂质,干燥 (remove impurities, dried)	9	10
铁皮枫斗 (<i>Dendrobii Officinalis Caulis</i>)	茎 (stem)	净制,边加热边扭成螺旋形或弹簧状,烘干 (net, twisted into a spiral or spring when heated, dried)	9	10
桔梗 (<i>Platycodonis Radix</i>)	根 (root)	净制,切片,干燥 (net, sliced, dried)	7	10
土鳖虫 (<i>Eupolyphaga Steleophaga</i>)	动物干燥体	净制,干燥,炒至微具焦斑 (net, dried, stir-fried to micro-focus)	9	10

2.2 供试品溶液的制备

每批抽取不少于 100 g 样品粉末,混合均匀。称取样品粉末 25 g,加入 0.9% 无菌氯化钠溶液 225 mL,用均质器拍打 1~2 min,静置 1 min 后,取上清液作为 1:10 供试品溶液。

2.3 控制菌检查

本研究所选 6 类中药饮片均为需煎煮的饮片,参照《中国药典》2015 年版〈非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法〉,进行耐胆盐革兰阴性菌和沙门菌的检查。

2.3.1 耐胆盐革兰阴性菌检查 取 10 g 样品用胰酪大豆胨液体培养基 (TSB) 制备成 1:10 供试品溶液,混匀,20~25 °C 培养 2 h。取相当于 1 g 样品的上述预培养物接种至 100 mL 肠道菌增菌液体培养基中,30~35 °C 培养 24~48 h 后,划线接种于紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基平板上,30~35 °C 培养 18~24 h。

2.3.2 沙门菌检查 取 10 g 样品接种至 200 mL TSB 中,混匀,33 °C 培养 18~24 h。取上述培养物 0.1 mL,接种至 10 mL RV 沙门增菌液体培养基中,33 °C 培养 18~24 h。取少量 RV 沙门增菌液体培养物,划线接种于木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基平板上,33 °C 培养 18~48 h。

2.3.3 菌落鉴定 挑取上述紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基和木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基上生长的不同形态特征的微生物菌落,划线接种于 TSA 平板进行分离纯化。采用 VITEK 生化鉴定系统,对纯化后的微生物进行鉴定。

2.4 16S rRNA 高通量测序

2.4.1 16S rRNA 序列扩增和测序 采用 Illumina Miseq 高通量核酸测序平台,直接对未经培养的 6 类中药饮片的 60 批样品中污染的微生物类群进行分析。对“2.2”项下制备的供试品溶液,采用 TAKARA 细菌基因组试剂盒,提取污染微生物 DNA,作为测序模板。采用两步 PCR 扩增方法构建测序文库,针对 16S rRNA 的 V4-V5 区,采用引物 515F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' 和 926R 5'-CCGTCAATTCMTTGGAG TTT-3',进行 PCR 扩增^[12]。琼脂糖凝胶电泳检测后,对 PCR 阳性扩增产物,采用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒进行回收。以回收的 PCR 产物为模板,采用 5'Miseq 接头 -barcode- 测序引物 - 特异引物 -3' 的融合引物,进行二次 PCR 扩增加入测序标签,用 AMPure XP beads 纯化各样品 PCR 产物。用 Qubit 3.0 fluorometer 对纯化 PCR 产物进行定量分析,均一化混均后,采用 MiSeq Reagent Kit v3 (2 × 300 cycle) 芯片进行测序。

2.4.2 序列处理和分析 测序完成后,根据 barcode

条形码信息拆分各个样本的数据,并对序列质量进行质控和过滤,只有当原始序列中含有完整的 barcode 标签序列时,该条序列才被认可为有效序列。基于 PE reads 之间的 overlap 关系进行拼接,拼接后的序列再次进行质控过滤,去除非特异性扩增并含有模糊碱基、单碱基高重复区的序列,以及 PCR 过程产生的一些嵌合体。序列质控采用 Trimmomatic 软件,序列拼接采用 FLASH 软件。利用 USEARCH 软件,将优化拼接好的序列进行 OTU (operational taxonomic units) 聚类分析,得到 OTU 代表序列后,通过 Mothur 软件将 OTU 代表序列与数据库比对,进行物种信息注释(设定阈值为 0.8),获得分类学信息^[13],并分别在各个分类单元统计各样本的群落组成及物种丰度信息。

3 实验结果

3.1 控制菌检查

60 批中药饮片样品的耐胆盐革兰阴性菌和沙门菌的检查结果如表 2 所示。其中,耐胆盐革兰阴性菌在 28 批样品中检出,而沙门菌在所有样品中均未检出。不同类别中药饮片中耐胆盐革兰阴性菌检出率差异较大,仅经过净制、干燥炮制工艺的饮片耐胆盐革兰阴性菌的污染率较高,如柴胡样品中检出率达 90%,黄芪、枸杞子、桔梗样品中检出率在 50% 以上;而炮制工艺包含热处理的铁皮枫斗和土鳖虫样品中的耐胆盐革兰氏阴性菌的污染率较低,分别为 0 和 10%。

3.2 菌落鉴定分析

紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基和木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基上微生物菌落的鉴定结果如表 3 所示。不同饮片品种中污染的微生物均属于变形菌门,分布于 6 个科,14 个属。其中检出比例最高的为肠杆菌科,其次为假单胞菌科。不同饮片样品中检出的污染微生物种类具有明显的差异,柴胡和黄芪样品中检出 8 种污染菌,铁皮枫斗样品中仅能检出一类泛菌属细菌,而其他饮片品种中则至少能检出 3 种以上的污染菌。值得关注的是,本研究从 6 类中药饮片中检出了阪崎克罗诺杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、奇异变形杆菌等重要的条件致病菌。

3.3 微生物群落特征的高通量测序分析

通过 Miseq 测序平台对 6 类中药饮片污染微生物的多样性进行分析,分别成功从 10 批柴胡、

表 2 6 类中药饮片中控制菌检查信息

Tab. 2 The control bacteria test results of six kinds of Chinese herbal pieces

中药饮片 (Chinese herbal pieces)	批次 (batch)	阳性样品数 (number of positive samples)	
		耐胆盐革兰阴性菌 (bile salt tolerant gram negative bacteria)	沙门菌 (Salmonella)
柴胡 (Bupleuri Radix)	10	9 (90%)	均未检出 (not detected)
黄芪 (Astragali Radix)	10	7 (70%)	
枸杞子 (Lycii Fructus)	10	5 (50%)	
铁皮枫斗 (Dendrobii Officinalis Caulis)	10	0	
桔梗 (Platycodonis Radix)	10	6 (60%)	
土鳖虫 (Eupolyphaga Steleophaga)	10	1 (10%)	
全部 (total)	60	28 (47%)	0

注 (note): 括号内为中药饮片样品中耐胆盐革兰阴性菌检出率 (indicates the positive rate of bile salt tolerant gram negative bacteria in the parentheses)

10 批黄芪、5 批枸杞子、6 批铁皮枫斗、10 批桔梗和 10 批土鳖虫样本的 1:10 供试品溶液中,获得有效 PCR 扩增及高通量测序。不同饮片获得的有效序列信息如表 4 所示,其中桔梗样品中获得了最多的有效序列 (186 748 条),其次为柴胡 (168 998 条),铁皮枫斗获得的有效序列最少 (86 073 条),序列的平均长度为 412 bp。在 97% 相似度下,将有效序列进行 OTUs 聚类分析,所有样品中共计产生 584 个 OTUs,其中柴胡中 OTUs 种类最多 (390 个),其次是土鳖虫 (280 个),铁皮枫斗的 OTUs 个数最少 (174 个)。

利用 Mothur 软件做 Rarefaction 分析,制作稀释曲线 (图 1-A)。由图可知,随着测序序列数目的增加,测序样品的曲线基本趋于平稳,表明测序数据量渐进合理,能够真实反映样品中的细菌群落构成。图 1-B 是丰度等级图,能够反映测序样本的物种丰度和均匀度。从图 1-B 可知,不同饮片样本之间的物种丰度和均匀度具有明显差异。

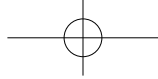


表 3 6类中药饮片污染微生物的鉴定结果

Tab. 3 Identification results of contaminated microorganisms from six Chinese herbal pieces

饮片品种 (Chinese herbal pieces)	科 (family)	属 (genus)	种 (species)			
柴胡 (Bupleuri Radix)	肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)	泛菌属 (<i>Pantoea</i>)	成团泛菌 (<i>Pantoea agglomerans</i>) 泛菌属某些种 (<i>Pantoea</i> spp.)			
		肠杆菌属 (<i>Enterobacter</i>)	阴沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>) 中间肠杆菌 (<i>Enterobacter intermedius</i>)			
		克罗诺杆菌属 (<i>Cronobacter</i>)	阪崎克罗诺杆菌 (<i>Cronobacter sakazakii</i>)			
		克雷伯菌属 (<i>Klebsiella</i>)	肺炎克雷伯菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)			
		假单胞菌科 (Pseudomonas)	假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>)	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>) 铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)		
			黄芪 (Astragali Radix)	肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)	爱文氏菌属 (<i>Ewingella</i>)	美洲爱文氏菌 (<i>Ewingella americana</i>)
					埃希菌属 (<i>Escherichia</i>)	赫氏埃希菌 (<i>Escherichia hermannii</i>)
					肠杆菌属 (<i>Enterobacter</i>)	阴沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>)
					泛菌属 (<i>Pantoea</i>)	成团泛菌 (<i>Pantoea agglomerans</i>) 泛菌属某些种 (<i>Pantoea</i> spp.)
					莫拉菌科 (Moraxaceae)	不动杆菌属 (<i>Acinetobacter</i>)
假单胞菌科 (Pseudomonas)	假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>)	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)				
枸杞子 (Lycii Fructus)	肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)	勒克氏菌属 (<i>Leclercia</i>)	非脱羧勒克氏菌 (<i>Leclercia adecarboxylata</i>)			
		肠杆菌属 (<i>Enterobacter</i>)	阴沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>)			
		泛菌属 (<i>Pantoea</i>)	泛菌属某些种 (<i>Pantoea</i> spp.)			
铁皮枫斗 (Dendrobii Officinalis Caulis)	肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)	泛菌属 (<i>Pantoea</i>)	泛菌属某些种 (<i>Pantoea</i> spp.)			
桔梗 (Platycodonis Radix)	肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)	泛菌属 (<i>Pantoea</i>)	泛菌属某些种 (<i>Pantoea</i> spp.)			
		柠檬酸杆菌属 (<i>Citrobacter</i>)	塞氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter sedlakii</i>)			
	假单胞菌科 (Pseudomonas)	假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>)	施氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)			
	巴斯德氏菌科 (Pasteuraceae)	巴斯德氏菌属 (<i>Pasteurella</i>)	犬巴斯德氏菌 (<i>Pasteurella canis</i>) 多杀巴斯德氏菌 (<i>Pasteurella multocida</i>)			
	气单胞菌科 (Aeromonas)	气单胞菌属 (<i>Aeromonas</i>)	杀鲑气单胞菌 (<i>Aeromonas salmonicida</i>)			
	鞘氨醇单胞菌科 (Sphingomonas)	鞘氨醇单胞菌属 (<i>Sphingomonas</i>)	少动鞘氨醇单胞菌 (<i>Sphingomonas paucimobilis</i>)			
	土鳖虫 (Eupolyphaga Steleophaga)	肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)	克雷伯菌属 (<i>Klebsiella</i>)	肺炎克雷伯菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)		
			克罗诺杆菌属 (<i>Cronobacter</i>)	阪崎克罗诺杆菌 (<i>Cronobacter sakazakii</i>)		
肠杆菌属 (<i>Enterobacter</i>)			阴沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>)			
变形杆菌属 (<i>Proteus</i>)			奇异变形杆菌 (<i>Proteus mirabilis</i>)			

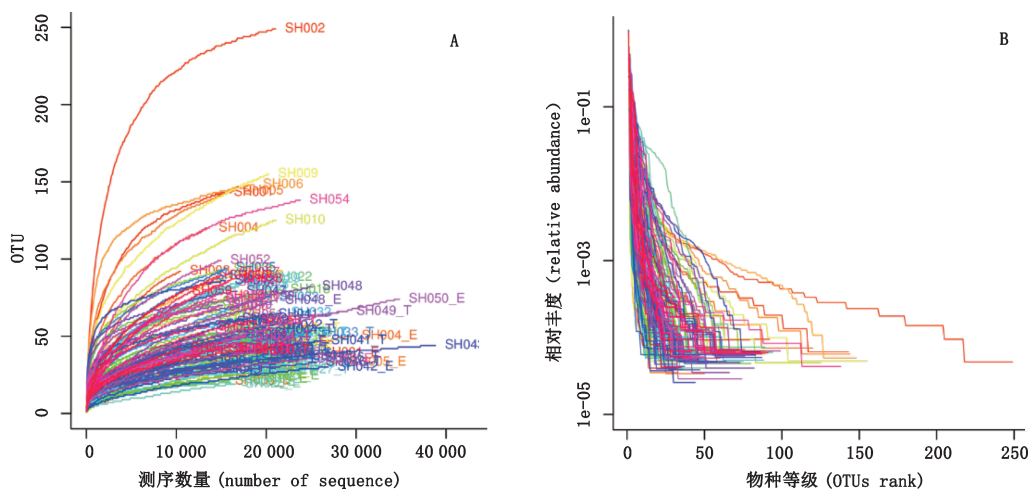
表 4 6 类中药饮片高通量测序信息统计

Tab. 4 Statistical analysis of high-throughput sequencing data in six Chinese herbal pieces

饮片种类 (Chinese herbal pieces)	批数 (batches)	成功测序批数 (successful sequencing of batches)	有效序列 (effective sequence)	OTUs
柴胡 (Bupleuri Radix)	10	10	168 998	390
黄芪 (Astragali Radix)	10	10	155 686	197
枸杞子 (Lycii Fructus)	10	5	103 543	176
铁皮枫斗 (Dendrobii Officinalis Caulis)	10	6	86 073	174
桔梗 (Platycodonis Radix)	10	10	186 748	214
土鳖虫 (Eupolyphaga Steleophaga)	10	10	157 916	280

根据不同饮片样品中 OTU 分类学注释结果,分别在门和属水平下进行污染微生物相对丰度的统计分析。从图 2 可知,不同类别饮片中污染菌多集中于变形菌门 Proteobacteria 和厚壁菌门 Firmicutes。一些细菌门类群在不同类别饮片中的分布具有差异,如蓝藻细菌门 Cyanobacteria 主要分布于柴胡、黄芪、枸杞子和桔梗中。放线菌门 Actinobacteria 和拟杆菌门 Bacteroidetes 则分布于除土鳖虫外的其他 5 种饮片品种中,而浮霉菌门 Planctomycetes 仅可在枸杞子和铁皮枫斗中检测到。

不同类别中药饮片样品中污染微生物属水平类群的比较分析如图 3 所示,细菌相对丰度大于 1% 的细菌属共计 27 个,其中在柴胡中发现 7 个,黄芪中 9 个,枸杞子中 9 个,铁皮枫斗中 9 个,桔



A. 稀释曲线图 (rarefaction curve) B. 丰度等级图 (rank-abundance)

图 1 16SrRNA 高通量测序样本的多样性曲线

Fig. 1 The diversity curves of tested samples through 16SrRNA high-throughput sequencing

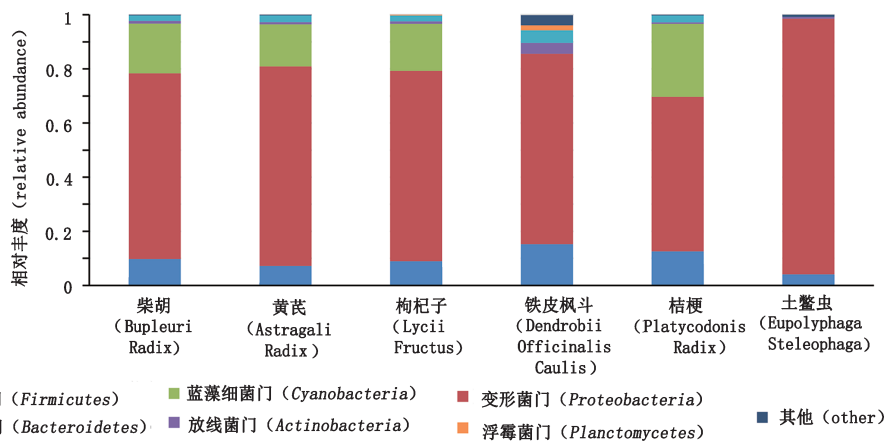


图 2 6 类中药饮片样品中污染微生物门水平相对丰度统计分析

Fig. 2 Statistical analysis of relative abundance at microbial taxonomic phylum levels in six Chinese herbal pieces

梗中 9 个,土鳖虫中 5 个。进一步分析发现,不同中药饮片品种中的优势菌属具有明显差异,其中柴胡、铁皮枫斗和桔梗样品中的优势菌属为泛菌属

Pantoea,黄芪中的优势菌属为魏斯氏菌 *Weissella*,枸杞子为链球菌 *Streptococcus*,而土鳖虫为立克次氏体 *Rickettsiella*。

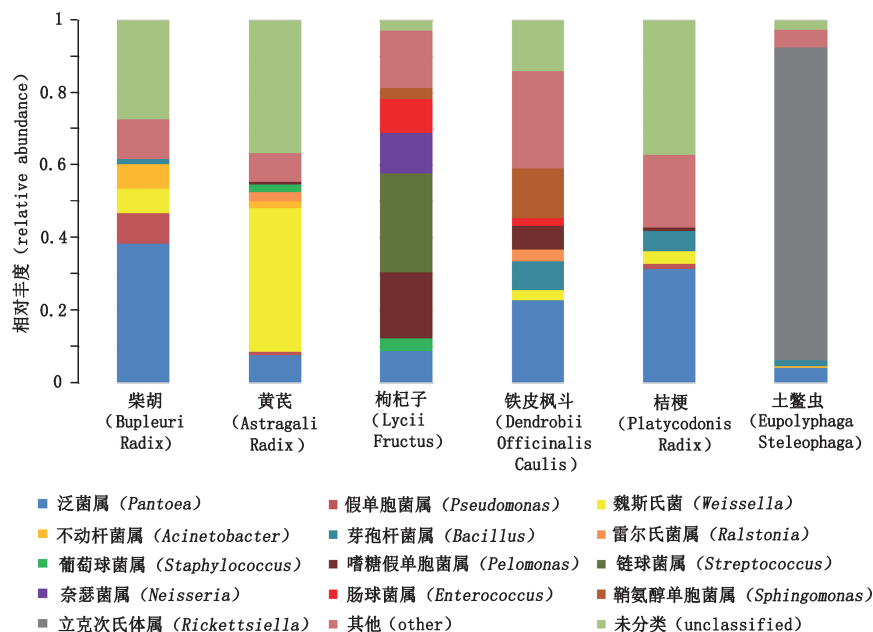


图 3 6 种中药饮片样品中污染微生物属水平相对丰度统计分析

Fig. 3 Statistical analysis of relative abundance at microbial taxonomic genus levels in six Chinese herbal pieces

4 讨论

4.1 不同类别中药饮片中耐胆盐革兰阴性菌污染差异分析

控制菌检查是传统微生物限度检查法评估污染微生物风险的主要方式。本研究参照《中国药典》2015 年版,对柴胡、黄芪、枸杞子、铁皮枫斗、桔梗和土鳖虫共 6 类中药饮片样品进行了耐胆盐革兰阴性菌和沙门菌检查。结果显示,47% 的中药饮片样品中检出耐胆盐革兰阴性菌,而沙门菌均未检出。不同类别中药饮片中耐胆盐革兰阴性菌的检出率差异较大,且经过净制、干燥等简单炮制工艺的饮片中耐胆盐革兰阴性菌检出率远高于炮制工艺包含热处理的饮片,说明耐胆盐革兰阴性菌污染情况的差异可能与饮片的加工炮制工艺相关。甘永琦等^[7]的研究也发现,“切碎”和“炮炙”两类饮片中耐胆盐革兰阴性菌污染具有显著差异,经过“炮炙”的饮片样品中耐胆盐革兰阴性菌的污染量均 $<10 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。因此,切制、净制、干燥等简单炮制工艺的中药饮片更需注意加工过程中的微生物污染控制。

4.2 中药饮片中重要条件致病菌的污染情况

肠杆菌科、假单胞菌属和气单胞菌属被认为是

最主要的耐胆盐革兰阴性菌的来源,包含了多种致病菌和条件致病菌^[14]。与前期研究结果一致,本研究采用传统控制菌检查法,发现紫红胆盐葡萄糖琼脂和木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂平板上分离的微生物菌落主要隶属于肠杆菌科、假单胞菌属等。其中,检出的阪崎克罗诺杆菌、奇异变形杆菌为肠杆菌科的致病菌或条件致病菌,可引发不同程度的肠道疾病^[15],由此可见,直接口服类饮片对耐胆盐革兰阴性菌的控制十分必要。此外,检出的肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、溶血不动杆菌、鲍氏不动杆菌等属于重要的条件致病菌,可引发呼吸道疾病、血液感染、皮肤伤口感染等^[16-18]。这些微生物虽然通过口服引起疾病的可能性很小,但它们的存提示着外用类饮片可能存在着一定的用药风险,并且在饮片加工和使用过程中还存在交叉污染的可能和感染从业人员的风险。

4.3 不同中药饮片中微生物群落组成差异分析

本研究基于 16S rRNA 高通量测序方法,研究了 6 类中药饮片品种中污染微生物群落组成的多样性。变形菌门和厚壁菌门是污染中药饮片的主要优势群落,特别是变形菌门的微生物群落(大多为革兰阴性

菌), 占到了中药饮片微生物污染量一半以上。值得注意的是, 具有一定致病性微生物的链球菌属、肠球菌属和葡萄球菌属在中药饮片中也占有一定的比例。此外, 不同中药饮片品种中污染微生物群落的组成具有一定差异, 这可能跟中药饮片本身和原始生长环境具有相关性。蓝藻门微生物群落主要分布于来自植物根部的中药饮片品种中^[19], 如柴胡、黄芪和桔梗都是来自于植物的根部, 根部与泥土密切接触, 易携带蓝藻门微生物群落。此外, 立克次氏小体属占到了土鳖虫微生物群落的 80% 以上, 在其他中药饮片品种中几乎没有分布, 而有研究表明, 立克次氏小体属主要寄生于节肢动物中^[20]。

4.4 16S rRNA 高通量测序在微生物群落研究中的优势

基于 16S rRNA 高通量测序微生物多样性分析, 未经过增菌培养, 直接从 6 类中药饮片获得了 6 个主要门类群和 27 个属类群的微生物群落信息。而通过传统微生物培养方法, 仅能分离获得 1 个门类群, 14 个属类群的污染微生物信息。相较于传统培养法, 基于 16S rRNA 高通量测序方法能够获得更加全面的中药饮片污染微生物群落信息, 特别是一些传统培养无法获得的微生物群落, 本研究发现的立克次氏小体属, 以及污染量较低的微生物^[21], 如沙雷氏菌属、寡养单胞菌属、嗜血杆菌属等相对丰度在 1% 以下微生物在传统培养方法中未获得相应的信息。

4.5 16S rRNA 高通量测序在微生物群落风险评估中的不足

中药饮片一些加工工艺, 如炮炙, 会导致饮片样品中污染微生物失活。而 16S rRNA 高通量测序通常针对样品中所有的 DNA, 死的微生物也可能被检测到, 因此, 16S rRNA 高通量测序需与传统培养方法相结合才能更准确地评估中药饮片样品中污染微生物的风险。16S rRNA 高通量测序选择测序目标区域的不同, 也会对测序结果产生影响, 如 Hong 等^[22]研究发现, 当在 97% 水平下定义 OTU 时, 测序区选择 V4-V5 区产生的误差值最小 (3%), V3 区 (5.2%) 次之。因此, 鉴于 16rRNA 基因结构的复杂性, 运用多种分子生物学方法相结合, 才能更全面地评估样品中微生物种群多样性。此外, 16S rRNA 高通量测序会产生大量的数据, 加大了研究者对高通量测序结果分析的难度, 若选择数据分析方法不可靠, 也会

对高通量测序结果的准确性带来偏差, 所以应当谨慎地选择数据分析方法和策略, 保证测序结果的准确性。

综上, 16S rRNA 高通量测序方法能够对中药饮片样本中污染微生物多样性进行快速、全面的分析, 但受限于方法本身的分辨能力和样本微生物污染水平等因素, 还需与传统培养方法相结合才能够更加全面地评估中药饮片污染微生物的风险。此外, 多种重要条件致病菌的检出提示, 中药饮片污染微生物具有一定的致病风险。因此, 十分有必要通过合理的中药饮片微生物限度标准引导饮片企业加强生产过程的管理和控制, 从而有效防范中药饮片的微生物致病风险, 提高中药饮片质量安全。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版。一部[S]. 2015: 凡例 XII ChP 2015. Vol I[S]. 2015: Ele VII
- [2] 王阶, 乔夕瑶, 林飞, 等. 中药饮片发展现状及质量管理中存在的问题与分析[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4475
WANG J, QIAO XY, LIN F, *et al.* Development of Chinese herbal pieces and analysis of problems of total quality management[J]. *China J Tradit Chin Pharm*, 2014, 39(22): 4475
- [3] 刘鹏, 许华玉, 特玉香, 等. 中药饮片微生物限度的考察与思考[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(8): 628
LIU P, XU HY, TE YX, *et al.* Investigation and thinking on the microbial limit of traditional Chinese herbal piece[J]. *China J Tradit Chin Pharm*, 2002, 27(8): 628
- [4] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(20): 1747
HU CQ. Current situation and trend in pharmaceutical microbial control[J]. *Chin Pharm J*, 2015, 50(20): 1747
- [5] 范一灵, 李琼琼, 房蕊, 等. 上海地区 10 种中药饮片微生物污染情况研究[J]. 中草药, 2015, 46(13): 1908
FANG YL, LI QQ, FANG R, *et al.* A survey of microbial contamination for ten processed pieces of Chinese materia medica in Shanghai[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2015, 46(13): 1908
- [6] 绳金房, 杨晓莉, 李辉. 陕西省 12 种中药饮片微生物污染调查及风险评估[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(6): 608
SHENG JF, YANG XX, LI H. Investigation and risk assessment of 12 kinds of Chinese herbal medicines microbial contamination in Shaanxi province[J]. *Northwest Pharm J*, 2016, 31(6): 608
- [7] 甘永琦, 农浚, 零文超, 等. 广西等地区 9 种中药饮片微生物污染状况分析[J]. 中国药师, 2018, 21(5): 170
GAN YQ, NONG J, LING WC, *et al.* Analysis of microbial contamination status of 9 kinds of Chinese herbal pieces from

- Guangxi regions [J]. *China Pharm*, 2018, 21(5): 170
- [8] 刘鹏, 战宏利, 杨美琴, 等. 红花的微生物污染状况分析 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(7): 1257
LIU P, ZHAN HL, YANG MQ, *et al.* Study on the microbial contamination status of *Carthamus tinctorius* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(7): 1257
- [9] 刘鹏, 战宏利, 严倩倩, 等. 中成药口服给药制剂及其原料药微生物污染相关性分析 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(6): 1068
LIU P, ZHAN HL, YAN QQ, *et al.* Analysis of the correlation of microbial contamination of oral preparations of Chinese patent medicine and crude drugs [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(6): 1068
- [10] 张欣, 刘静, 沈国平, 等. 基于高通量测序研究青藏高原茶卡盐湖微生物多样性 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(8): 1834
ZHANG X, LIU J, SHEN GP, *et al.* Illumina-based sequencing analysis of microbial community composition in Chaka Salt Lake in Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Microbiology*, 2017, 44(8): 1834
- [11] 上海市食品药品监督管理局. 上海市中药饮片炮制规范 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008: 30
Shanghai Food and Drug Administration. Specifications for Processing Chinese Herbal Pieces in Shanghai [M]. Shanghai: Shanghai Scientific Technical Publishers, 2008: 30
- [12] WU LY, WEN CQ, QIN YJ, *et al.* Phasing amplicon sequencing on Illumina Miseq for robust environmental microbial community analysis [J]. *BMC Microbiol*, 2015, 15(1): 125
- [13] 李靖宇, 张琇. 腾格里沙漠不同生物土壤结皮微生物多样性分析 [J]. *生态科学*, 2017, 36(3): 36
LI JY, ZHANG X. Microbial diversity analysis of different biological soil crusts in Tengger desert [J]. *Ecolog Sci*, 2017, 36(3): 36
- [14] 邓彦, 王娅珂, 韩晓宇, 等. 不同品种根类中药饮片耐胆盐革兰阴性菌污染研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(21): 95
DENG Y, WANG YK, HAN XY, *et al.* Bile-resistant Gram-negative bacteria effect of different kinds of root decoction pieces [J]. *China J Tradit Chin Pharm*, 2017, 42(21): 95
- [15] 周澄宇. 118 株肠杆菌科病原菌分布及耐药分析 [J]. *检验医学与临床*, 2012, 9(23): 2943
ZHOU CY. Distribution and drug resistance analysis of 118 strains of Enterobacteriaceae [J]. *Lab Med Clin*, 2012, 9(23): 2943
- [16] 周蓉, 朱卫民, 黄文祥, 等. 855 株肺炎克雷伯菌感染的临床分布及耐药性分析 [J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(5): 363
ZHOU R, ZHU WM, HUANG WX, *et al.* Distribution and antibiotic resistance of 855 isolates of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Chin Antibiot*, 2013, 38(5): 363
- [17] 于守丽, 孙艺铸, 于清霞. 鲍氏不动杆菌感染的临床分布及耐药性分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(18): 1936
YU SL, SUN YT, YU QX. Clinical distribution and drug resistance of *Acinetobacter baumannii* causing infections [J]. *Chin J Nosocomiol*, 2013, 23(18): 1936
- [18] 叶钧强. 慢性阻塞肺疾病鲍曼 / 溶血不动杆菌感染探析 [J]. *中国实用医药*, 2013, 8(4): 10
YE JQ. Chronic obstructive pulmonary disease bauman / hemolysis of acinetobacter infection [J]. *Chin Pract Med*, 2013, 8(4): 10
- [19] 张俊逸, 蒋江峦, 刘擎, 等. 珠江广州段微生物和浮游植物群落与水质特征研究 [J]. *水生态学杂志*, 2011, 32(2): 38
ZHANG JY, JIANG JL, LIU Q, *et al.* The characteristics of microbial and phytoplankton community and water quality in the Guangzhou segment of Pearl River [J]. *J Hydroecol*, 2011, 32(2): 38
- [20] 苏其琛. Wolbachia 对草间钻头蛛发育历期和性比的影响及其水平传递途径研究 [D]. 武汉: 湖北大学, 2017
SU QC. The Horizontal Transmission of Wolbachia in *Hylyphantes graminicola* and Its Impact on Host's Developmental Stages and Sex Ratio [D]. Wuhan: Hubei University, 2017
- [21] YOU J, WU G, REN F, *et al.* Microbial community dynamics in Baolige oilfield during MEOR treatment, revealed by Illumina Miseq sequencing [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 100(3): 1469
- [22] HONG PY, WHEELER E, CANN IKO, *et al.* Phylogenetic analysis of the fecal microbial community in herbivorous land and marine iguanas of the Galápagos Islands using 16S rRNA-based pyrosequencing [J]. *ISME J*, 2011, 5(9): 1461

(本文于 2019 年 6 月 19 日收到)