

中药饮片中微生物的快速检测技术研究及风险评估方法初探

史亚^{1,2}, 赵红霞^{1,2}, 刘程智^{1,2}, 陈欢^{1,2*} (1.浙江省微生物技术与生物信息学研究重点实验室, 杭州 310012; 2.浙江天科高新技术发展有限公司, 杭州 310012)

摘要: 目的 考察 11 种常用中药饮片微生物携带状况, 评估安全风险, 初步建立饮片微生物数据库。方法 采用基因芯片方法, 检测白芍等 11 种常用中药饮片中所携带的细菌、真菌和病毒, 统计其微生物种类组成。结果 11 种饮片共检测到涵盖细菌、真菌、病毒三大类的 174 个微生物鉴定结果, 其中细菌占 75.29%。通过整理和分析 174 株微生物信息, 初步建立了饮片污染微生物数据库。饮片中沙门菌和耶尔森菌的检出率均为 45.45%(5/11), 志贺菌 36.36%(4/11)。多个样本检出条件致病菌, 如肺炎克雷伯菌检出率为 63.63%(7/11), 大肠埃希菌和阴沟肠杆菌为 45.45%(5/11), 铜绿假单胞菌 9.09%(1/11)。结论 中药饮片中存在微生物污染情况, 需要开展更深入的风险评估工作, 完善中药饮片微生物数据库信息, 保障中药饮片的用药安全。

关键词: 中药饮片; 微生物污染数据库; 风险评估

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)04-0461-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.04.016

引用本文: 史亚, 赵红霞, 刘程智, 等. 中药饮片中微生物的快速检测技术研究及风险评估方法初探[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(4): 461-465.

Study on Microorganism Rapid Detection Technology and Risk Assessment of Chinese Herbal Medicines

SHI Ya^{1,2}, ZHAO Hongxia^{1,2}, LIU Chengzhi^{1,2}, CHEN Huan^{1,2*} (1.Key Laboratory of Microbial Technology and Bioinformatics of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China; 2.Zhejiang TianKe Hi-Tech Development Co., Ltd., Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate 11 kinds of Chinese herbal medicine(CHM) microorganism contamination and assess potential risk, and establish the microorganism database of Chinese herbal medicine. **METHODS** The gene microarray technology was used to describe microbiome communities in 11 kinds of Chinese herbal medicines. **RESULTS** A total of 174 species of microorganism were identified, which consisted of bacteria, fungi, and virus. Bacteria was the most dominant fraction, which accounted for 75.29% of total microorganism. The microorganism database of CHM was initially established by sorting and analyzing of the detection results of 174 species of microorganisms. The detection rate for *Salmonella enterica*, *Yersinia* spp., and *Shigella* spp. were 45.45% (5/11), 45.45% (5/11), and 36.36% (4/11), respectively. Several opportunistic pathogenic bacteria, such as *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* were also detected. The detection rates were 63.63%(7/11), 45.45%(5/11), 45.45%(5/11), and 9.09%(1/11), respectively. **CONCLUSION** This study shows that CHM is contaminated by some microorganisms. Further research on risk assessment and microorganism database of CHM should be carried out to provide traceability analysis of pathogens so as to ensure the safety and efficacy of CHM.

KEYWORDS: Chinese herbal medicine; microbial contamination database; risk assessment

中药饮片(Chinese herbal medicine, CHM)是中药材经炮制加工后用于中医临床的产品^[1], 是中医药的重要特色和优势之一, 但目前其质量控制是中药质量控制的薄弱环节^[2]。由于中药饮片种类繁多, 炮制方法不一, 质量可控性和一致性较差, 在每年国家药品监督管理局组织的药品质量抽查中, 中药饮片的合格率都是最低的^[3-4]。因中药材在生长环境、采收加工、运输存储等过程中都容易携带或引入大量微生物^[5], 影响中药材的质量稳

定性, 而且微生物的代谢产物(如一些毒素)可能还会危害使用者。此外, 致病微生物的存在, 可能造成使用者的再次感染^[6]。因此, 检测中药饮片中所含有的微生物, 是控制其质量及用药安全的重要因素。

Axiom[®] Microbiome Array 基于微生物基因组序列数据, 分析保守区域和靶标特异性区域的非多态性序列, 可检出 11 000 多种微生物(包括古生菌、细菌、真菌、原生动物和病毒), 并利用它们

基金项目: 浙江省分析测试类项目(2018C37007); 浙江省国际科技合作高技术产业联合研发项目(2015C54004)

作者简介: 史亚, 女, 硕士, 助理工程师 Tel: (0571)56021011
副研究员 Tel: (0571)56021327 E-mail: chenhuan7809@gmail.com

E-mail: sy9321@tkgeneclub.com *通信作者: 陈欢, 男, 博士,

实现菌种和菌株水平的检测^[7-8]。本研究利用基因芯片的方法,对 11 种常用中药饮片中含有的微生物情况进行了调查,发现了一些病原微生物危害因子,初步评估了微生物污染风险,为开展建立饮片微生物数据库和微生物污染溯源提供支持。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

NANODROP 2000 分光光度计(美国 ThermoFisher), Qubit[®] 2.0 荧光计(美国 Life Technologies); 1600 型凝胶成像仪(上海天能科技有限公司); MM400 型振荡仪(德国 Retsch); DNeasy PowerSoil 试剂盒(Qiagen, 批号: 157039736); Axiom[™] Microbiome 24-Array Plate、GeneTitan[®]仪器均来自美国 ThermoFisher。

1.2 样本采集

参照中国药典(通则 0211)药材和饮片取样法抽取试验样本,抽取 100~500 g,混匀。白芍、麦冬等 11 种中药饮片来自于衢州、亳州、杭州、吉林等饮片公司,样本信息见表 1。样本购置于本地药店。

1.3 微生物基因组 DNA 提取

称取 20 g 样本加入 pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液 200 mL,振荡 30 min,超声处理 10 min。收集液体 6 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取沉淀,用于 DNA 提取。使用 DNeasy PowerSoil 试剂盒提取微生物基因组 DNA。DNA 片段大小用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,DNA 浓度用分光光度计测定。

1.4 微生物检测

微生物鉴定使用 Axiom[®] Microbiome Array,检测微生物包括细菌、真菌、病毒、原生动物和古生菌。

1.5 数据分析

使用 Axiom[™] 微生物检测分析软件,通过组合可能性最大化算法,预测靶标样本中的微生物种类。

2 结果

2.1 微生物来源的统计

对 11 种中药饮片的微生物进行检测,共鉴定得到 174 个种(属)。其中,郁金中被鉴定到的微生物种类最多(118 种),其次是山药和白芍,分别为 68 种和 52 种;微生物被检出种类最少的为麦冬(4 种),醋延胡索(4 种)和玄参(6 种),结果见表 1。由

此可见,微生物的检出种类的数量和饮片不同的来源部位(根、茎、花、果实)不相关,而和具体的饮片种类相关。

表 1 中药饮片中微生物的分布情况

Tab. 1 Distribution of microorganisms in Chinese herbal medicine

样本	来源部位	形状	炮制工艺	包装	生产日期	微生物种类
白芍	根	片	切制	袋装/散装	2017.12.9	52
白术	根	片	切制	袋装/散装	2017.12.1	32
麦冬	根	块	拌炒	袋装/散装	2017.9.1	4
玄参	根	片	切制	袋装/散装	2018.3.1	6
郁金	根	片	切制	袋装/散装	2017.8.1	118
浙贝母	茎	片	切制	袋装/散装	2017.8.1	28
醋延胡索	茎	片	醋制	袋装/散装	2018.1.1	4
山药	茎	片	切制	袋装/散装	2018.1.1	68
菊花	花	扁球形	净制	袋装/散装	2017.10.20	14
金银花	花	棒状	净制	袋装/散装	2017.12.2	8
砂仁	果实	椭圆形	净制	袋装/散装	2017.10.1	28

2.2 饮片微生物数据库

来自 11 种中药饮片的 174 种微生物,涵盖细菌、真菌、病毒三大类,其中细菌最多,共 131 个种,占有所有微生物的 75.29%,病毒和真菌较少,分别为 34 和 9 个种,所占比率为 19.54%和 5.17%。其中,细菌又包括 58 个属,以假单胞菌属的细菌种类最多,占全部微生物的 6.9%,其次为芽孢杆菌属和肠杆菌属,分别占有所有微生物的 5.75%和 5.17%,结果见表 2。假单胞菌属,专性需氧的革兰氏染色阴性无芽胞、有荚膜杆菌,呈杆状或略弯。大多数菌种的适宜温度为 30 ℃,主要分布于土壤、淡水、海水中,其中至少有 3 种对动物或人类致病。芽孢杆菌属无处不在,包括自由生活(非寄生)和寄生病原体。在压力环境条件下,细菌可以产生不是真正“孢子”的椭圆形内生孢子,但细菌可以自我减少并长时间处于休眠状态,它也被认为是一类耐热菌^[9]。肠杆菌属是一种常见的革兰氏阴性菌,兼性厌氧,杆状,非孢子形成的肠杆菌科细菌。这些细菌的几种菌株是致病性的并且在免疫受损(通常住院)的宿主和机械通气的那些宿主中引起机会性感染^[10]。

2.3 控制菌检查结果

在 11 个中药饮片中,有 10 个饮片检出受控

菌, 仅在麦冬中未检出。其中, 大肠埃希菌、沙门菌和耶尔森菌的检出率均为 45.45%(5/11), 志贺菌 36.36%(4/11)。多个样本检出条件致病菌, 如肺炎克雷伯菌检出率为 63.63%(7/11), 阴沟肠杆菌 45.45%(5/11), 铜绿假单胞菌 9.09%(1/11), 结果见表 3。根来源的郁金、白芍和茎来源的山药被检出的控制菌最多, 分别为 17, 12 和 15 个种。

表 2 饮片微生物种类检测统计结果

Tab. 2 The results of Chinese herbal medicine microorganism determination

微生物	数量	百分率/%
假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)	12	6.90
芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i>)	10	5.75
肠杆菌属(<i>Enterobacter</i>)	9	5.17
乳酸杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)	7	4.02
泛菌属(<i>Pantoea</i>)	6	3.45
肠球菌属(<i>Enterococcus</i>)	6	3.45
明串珠菌属(<i>Leuconostoc</i>)	5	2.87
克洛诺菌属(<i>Cronobacter</i>)	5	2.87
其他细菌	71	40.80
真菌	9	5.17
病毒	34	19.54
合计	174	100.00

2.4 芽孢杆菌检出情况

中药饮片中污染的耐热菌主要是芽孢菌类, 其耐热性极强, 不易被杀灭^[11-12]。本文对芽孢杆菌来评价饮片受耐热菌污染情况。11 个样本中 4 个检出芽孢杆菌属, 分别是白术、郁金、浙贝母和砂仁, 其中郁金的芽孢杆菌种类最多, 见表 4。

2.5 真菌、病毒检测结果

白芍、白术、玄参、金银花和砂仁等 5 个样本中检出真菌, 检出率为 45.45%。这些真菌常分布于土壤、空气和植物根际等环境。白芍、白术、菊花、郁金、金银花、砂仁、山药等 7 个样本检出病毒, 检出率为 63.63%, 这些病毒均为噬菌体。郁金的病毒种类最多, 其次为山药, 结果见表 5。

2.6 风险评估结果

此次调查检出了多种致病菌和条件致病菌。志贺菌是引起人细菌性痢疾的病原体, 引起腹泻、腹痛等肠道疾病。细菌性痢疾的发病率和病死率居感染性腹泻之首^[13]。其主要通过污染病原菌的水和食物传播, 人类对志贺菌普遍易感, 10~150

个细菌即可致病^[14]。沙门菌人畜共患传染病病原体, 可引起肠热症、食物中毒和败血症等^[15]。

表 3 中药饮片中控制菌检查结果

Tab. 3 Control bacterial results of Chinese herbal medicine

样本	来源部位	种类	控制菌
郁金	根	17	<i>Enterobacter</i> sp. MGH 5, <i>Enterobacter</i> sp. MGH 25, <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. MOIL14HWK12, <i>Salmonella enterica</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Pseudomonas mendocina</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella</i> sp. KCL-2
白芍	根	12	<i>Enterobacter</i> sp. MGH 34, <i>Enterobacter cancerogenus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. CF149, <i>Shigella flexneri</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>
白术	根	7	<i>Pseudomonas</i> sp. CBZ-4, <i>Pseudomonas brassicacearum</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. ICMP 17674, <i>Yersinia pestis</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella variicola</i>
玄参	根	1	<i>Enterobacter</i> sp. MR1
麦冬	根	0	-
山药	茎	15	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Escherichia fergusonii</i> , <i>Enterobacter</i> sp. MGH 25, <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter</i> sp. R4-368, <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella</i> sp. KCL-2
浙贝母	茎	9	<i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 25886, <i>Escherichia fergusonii</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Enterobacter</i> sp. MGH 16, <i>Enterobacter</i> sp. R4-368, <i>Enterobacter</i> sp. BIDMC 26, <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
醋延胡索	茎	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
菊花	花	5	<i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. MOIL14HWK12, <i>Pseudomonas</i> sp. ICMP 17674, <i>Enterobacter mori</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
金银花	花	3	<i>Pseudomonas</i> sp. MOIL14HWK12, <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
砂仁	果实	7	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Pseudomonas mendocina</i> , <i>Enterobacter</i> sp. BIDMC 29, <i>Klebsiella pneumoniae</i>

表 4 芽孢杆菌检出结果

Tab. 4 The detection results of *Bacillus* spp.

样本	芽孢杆菌
白术	<i>Bacillus subtilis</i>
郁金	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus</i> sp. RP1137, <i>Bacillus</i> sp. J37, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus clausii</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
浙贝母	<i>Bacillus</i> sp. JGI 0001002-E22
砂仁	<i>Bacillus lehensis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>

表 5 中药饮片真菌和病毒检测结果

Tab. 5 Fungi and virus detection results of Chinese herbal medicines microbial

样本	真菌	病毒
白芍	<i>Aspergillus ruber</i> , <i>Mucor velutinosus</i> , <i>Spathaspora arborariae</i>	Enterobacteria phage Ike, Enterobacteria phage HK106
白术	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Leuconostoc phage phiLN25
菊花	-	Bacillus phage SPP1
玄参	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium circinatum</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i>	-
郁金	-	Enterobacteria phage Sfl, Klebsiella phage KP32, Salmonella phage SKML-39, Bacillus phage Raggi, Enterobacteria phage HK225, Cronobacter phage ENT47670, Enterobacteria phage HK630, Enterobacter phage PG7, Cronobacter phage ESP2949-1, Klebsiella phage 0507-KN2-1, Klebsiella phage F19, Klebsiella phage KP36, Cronobacter phage vB_CskP_GAP227, Enterobacteria phage mEp237
金银花	<i>Alternaria arborescens</i>	Heliothis virescens ascovirus 3a, Lepidopteran iteradenovirus 5
砂仁	<i>Aspergillus ruber</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>	Shigella phage Sf6, Enterobacteria phage lambda
山药	-	Enterobacteria phage RB16, Yersinia phage phiYeO3-12, Enterococcus phage IME-EF1, Enterobacteria phage TLS, Klebsiella phage NTUH-K2044-K1-1, Cronobacter phage CR9, Enterobacteria phage lambda, Salmonella phage FSL SP-076, Salmonella phage FSL SP-076, Enterobacteria phage K30, Klebsiella phage 0507-KN2-1, Klebsiella phage 0507-KN2-1, Salmonella phage SSU5, Lactococcus phage ul36, Enterobacteria phage Sfl, Enterobacteria phage HK225, Enterobacteria phage phi80, Klebsiella phage KP36

鼠疫耶尔森是鼠疫的病原菌。鼠疫为法定甲类传染病，人类通过接触感染的动物、食入污染食物或被节肢动物叮咬等途径而被感染。可引起腺鼠疫、肺鼠疫等。肺鼠疫又称黑死病，死亡率近 100%。小肠结肠耶尔森菌是引起人类严重的小肠结肠炎病原菌，通过食用污染的食物感染^[14]。此次调查还发现了其他机会致病菌，如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、枸橼酸杆菌和肠球菌等，对免疫力低下人群构成一定威胁。

用药途径方面，11 种饮片均为口服类药物，这些致病菌都可通过消化道传播。在用法方面，菊花和金银花可通过热水冲泡后服用。如果微生物在饮片褶皱处大量繁殖，形成生物膜，经过短暂加热可能依然能存活，会对用药安全性造成一定的风险。

3 讨论

与中药材和中成药质量标准相比，中药饮片的微生物质量控制被长期忽视。我国中药饮片整体微生物负载水平较高，并已影响到饮片自身和其下游中成药产品的质量和安全性^[16-17]。中国药典 2015 年版首次对中药饮片的微生物限度进行控制，只对沙门菌和耐胆盐革兰阴性菌进行了强制性规定^[1]。2018 年 2 月，国家药典委员会发布了中国药典 2020 年版“中药饮片微生物限度检查法”(增修订草案)。这是国家药典委员会首次对研粉口服用贵细饮

片、直接口服及泡服饮片的需氧菌总数以及霉菌和酵母菌总数限度做了规定，并对煎煮类饮片耐热菌数限度进行了规定^[18]。中国药典 2015 年版一部对饮片用法用量的描述“除另有规定外，用法系指水煎内服”，具体标注用法的特别少，基本只标注用量。但是一些饮片，如菊花、枸杞等，消费者习惯泡服，如何权衡就需要企业进行风险评估。

中国药典 2015 年版中对饮片微生物检测方法仅为传统的培养法，由于培养法具有准确率差、效率低等缺点，并且微生物本身的特性，大部分微生物无法在实验室条件下培养。更重要的是，该方法只能对某几类微生物进行检查，不能获得微生物群落组成信息。这阻碍了人们对中药饮片中微生物的了解与认识。本研究首次采用基因芯片的方法，全面系统地调查饮片中微生物种类，包括细菌、真菌、病毒、原生动物和古生菌，更加真实、有效地了解饮片微生物的组成和危害因子，为中药饮片微生物污染风险评估提供支持，保障用药安全。当然，基于分子检测的方式也存在不区分死活菌的缺陷，其检测结果包括了不具有感染性的非活性菌。下一步笔者将采用培养或者可以特异鉴定活菌的方法来进一步验证。

根据微生物的种类分析发现，大部分微生物广泛存在于自然界及人与动物肠道中，提示饮片负载微生物主要来源于土壤背景微生物、施肥种植管理导致的细菌污染。后期加工是饮片负载微

生物来源的另一个重要原因^[19]。中药饮片的炮制过程多数较为简单,尤其对于那些仅需简单净制不需要特殊处理即可服用的“原形饮片”(果实类、种子类和花类等),仅通过去除杂质、分拣或水洗等简单的净制手段,并不能完全去除药材中的微生物。即使经过加热或酒精处理等工艺也不能完全去除潜在的微生物致病性风险,尤其是耐热菌和各类微生物的毒素残留^[20]。饮片在出厂后到终端消费者,还需经过运输和储藏等环节,这些环节的随意性,也使得饮片易受到微生物污染。此外,目前没有明确规定中药饮片的使用年限。但不同的中药饮片因其自身特点,其存放时间往往不同。

本研究对11种饮片进行微生物检查,初步建立了中药饮片微生物数据库。但是数据库的建立是个持续动态的过程,建立中药饮片的微生物监测、控制、预警和污染回溯系统,是规范中药产业生产安全性的重大需求。今后的工作还需进一步完善数据库信息,提高微生物污染溯源技术,为今后开展饮片微生物风险评估和不良事件调查提供技术平台。

REFERENCES

[1] 中国药典. 一部[S]. 2015.
[2] LIU H X, CAO X Y. Contamination and limits for aerobic bacteria, mold and yeast in processed pieces of Chinese material medica [J]. *Tianjin Pharmacy(天津药学)*, 2017, 29(1): 9-14.
[3] YANG X L, LI H, SHEN J F. 12 kinds of Chinese herbal medicine thermophilic bacteria contamination investigation and risk assessment [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med(陕西中医)*, 2016, 37(6): 740-743.
[4] 曹明成, 黄泰康. 我国中药饮片质量的影响因素分析和对策[J]. *中国药业*, 2016, 25(6): 7-10.
[5] YAN D, YUAN X, XIE D S, et al. Research status and thoughts on sterilization of Chinese herbal medicine pieces [J]. *Chin Tradit Herb Drug(中草药)*, 2016, 47(8): 1425-1429.
[6] 杨雪芹, 郭放, 夏延军, 等. 浅谈中药饮片企业如何推行2015 版药典[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2016, 3(35):

7085-7086.
[7] GARDNER S N, JAING C J, MCLOUGHLIN K S, et al. A microbial detection array (MDA) for viral and bacterial detection [J]. *Bmc Genomics*, 2010, 11(1): 668. Doi: 10.1186/1471-2164-11-668.
[8] MCLOUGHLIN K S. Microarrays for pathogen detection and analysis [J]. *Brief Funct Genomics*, 2011, 10(6): 342-353.
[9] MADIGAN, MICHAEL T, MARTINKO, et al. *Brock biology of microorganisms* [M]. Prentice Hall, 2007: 1032.
[10] TAN W S, YUNOS N Y, TAN P W, et al. Freshwater-borne bacteria isolated from a Malaysian rainforest waterfall exhibiting quorum sensing properties [J]. *Sensors*, 2014, 14(6): 10527-10537.
[11] KIMBERLY P B, SANJEEV A, ALVARO G. Prevalence of thermophilic bacteria and spores on 10 midwest dairy farms [J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(11): 6777-6784.
[12] WANG J, LUO H X, HUANG Y F. The damage of thermophilic bacteria to milk and methods of prevention [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2011, 255-260(9): 3727-3730.
[13] HAO C T, THANH D P, HOLT K E, et al. The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(4): 235-250.
[14] 严杰. *医学微生物学*[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2016.
[15] MURAKAMI T, DELONG J, EILBER F C, et al. Tumor-targeting salmonella typhimurium A1-R in combination with doxorubicin eradicate soft tissue sarcoma in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) model [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11): 12783-12790.
[16] ALWAKEEL S S. Microbial and heavy metals contamination of herbal medicines [J]. *Res J Microbiol*, 2008, 3(12): 683-691.
[17] SHAO L C, PAN J W, XIE W M, et al. Microbial contamination and microbial limit of *Chrysanthemi Flos* and *Fritillariae Thunbergii Bulbus* [J]. *Central South Pharmacy(中南药学)*, 2015, 13(10): 1093-1095.
[18] 中国药典委. 关于对《中国药典》2020 年版微生物通则草案(一)公开征求意见的通知[EB/OL]. <http://www.chp.org.cn/view/ff80808161653a930161d156386e6224?a=tz>.
[19] 江珍玉, 陈纯纯, 龚勇祥, 等. 5 种常见根类中药饮片微生物污染相关因素分析研究[J]. *中药材*, 2018, 41(7): 1594-1598.
[20] ZHANG Z L, ZHANG A T, ZHANG H W, et al. Effects of heating processing method on AFB1 content in TCM cut crude drug [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志)*, 2009, 14(4): 527-529.

收稿日期: 2018-08-07

(本文责编: 曹粤锋)