

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.07.029

生孢梭菌生长所需最低水分活度研究*

杨静¹, 李翠¹, 周志云¹, 马晓娟², 杨晓莉^{1△}

(1. 陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065; 2. 陕西盛德泰林生物安全技术检测有限公司, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 探讨用不同介质调节培养基的水活度, 严格厌氧微生物生孢梭菌生长所需的最低水分活度。方法 用氯化钠、蔗糖及甘油调节梭菌增菌培养基的水分活度, 取制备好的新鲜菌悬液, 用无菌生理盐水稀释成每1 mL含 10^4 cfu的菌悬液。将上述菌液分别加入3种调节好的梭菌增菌培养基水分活度中, 取1 mL稀释至适宜的稀释级注于皿倾注哥伦比亚琼脂培养基, 待培养基凝固后装入厌氧培养袋, 在35℃培养72 h, 计数。结果 以氯化钠、蔗糖及甘油调节梭菌增菌液的水分活度, 生孢梭菌生长所需最低水分活度分别为0.95~0.96, 0.95~0.96, 0.92, 其中甘油的试验结果相对稳定, 生孢梭菌生长所需最低水分活度最低。结论 该方法可为水分活度测定在我国非无菌制剂微生物控制中的应用和2020年版《中国药典》相关内容的修订提供参考。

关键词:水分活度; 非无菌制剂; 微生物控制; 生孢梭菌

中图分类号: R917; R927.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)07-0102-03

Minimum Water Activity Required for the Growth of *Clostridium Sporogenes*

YANG Jing¹, LI Cui¹, ZHOU Zhiyun¹, MA Xiaojuan², YANG Xiaoli¹

(1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065; 2. Shaanxi Shengdetailin Biological Safety Technical Testing Co. Ltd., Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: **Objective** To explore the minimum water activity required for the growth of strictly anaerobic microorganisms *Clostridium sporogenes*, where the water activity is regulated by different media. **Methods** Sodium chloride, sucrose and glycerin were used to regulate the water activity of clostridium culture medium. The prepared fresh bacterial suspension was diluted with sterile normal saline solution to prepare the bacterial suspension containing 10^4 cfu per 1 mL. The above bacterial suspension was added into three kinds of clostridium culture media, of which the water activity had been well-regulated. The 1 mL solution was diluted to appropriate dilution level and poured into plate, together with Colombian Agar medium. After the medium solidified, it was loaded into anaerobic culture bag, cultured at 35℃ for 72 h, and then counted. **Results** The minimum water activity required by the growth of *Clostridium sporogenes* was 0.95-0.96, 0.95-0.96 and 0.92, respectively. The glycerol test results were relatively stable, in which the minimum water activity required by the growth of *Clostridium sporogenes* was the lowest. **Conclusion** This method can provide data reference for the application of water activity measurement in microbial control of non-sterile preparations in China and the revision of relevant contents of the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition).

Key words: water activity; non-sterile product; microorganism control; *Clostridium sporogenes*

水分活度(A_w)是评价食品和化妆品微生物风险和产品稳定性的重要依据,在药品微生物控制中, A_w 测定已有一定应用前景^[1-2]。 A_w 与微生物的生长密切相关,微生物又是反映药品安全性和有效性的重要指标,大多数细菌在 A_w 低于0.91时停止生长,大多数霉菌在 A_w 低于0.80时停止生长^[3]。通过测定 A_w ,可更好地反映药品质量,且该测定无破坏性,省时省力,设备简单价廉,对于制药产品研发、生产环境控制、包装材料选择与药品成品保存等都有重要意义^[4]。查询文献[5-8],可得到一些与制药相关的代表性微生物生长所需的最低 A_w ,如铜绿假单胞菌、大肠埃希菌和沙门氏菌在水分活度低于0.91的产品中不会增殖或存活,革兰阳性菌如金黄色葡萄球菌在 A_w 低于0.86时不会增殖,黑曲霉在 A_w 低于0.77时不会增殖^[9]。但与制药相关的厌氧菌株由于生长条件严苛,其生长所需最低 A_w 研究较少。生孢梭菌为厌氧微生物的代表,为梭状芽孢杆

菌属,噬菌体约为 $1\mu\text{m}\times5\mu\text{m}$ 的革兰阳性杆菌,该菌未收录于《美国药典》1112的微生物生长所需的最低 A_w ,查阅国内外文献未找到其生长的最低 A_w ,因此目前无参考的最低 A_w 。本研究中参考《美国药典》1112收录肉毒梭菌生长所需最低 A_w (0.95)^[10]及文献[11-13],将培养基的 A_w 调至0.90~0.99,进行预试验及正式试验。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种:生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)(CMCC(B)64941),购自中国医学细菌保藏管理中心,工作用菌株为第3代。

试剂:硫乙醇酸盐流体培养基(批号为180830),梭菌增菌培养基(批号为170701),哥伦比亚琼脂培养基(批号为170717),均购自北京陆桥技术股份有限公司。丙三醇(批号为20180730),氯化钠(批号为20180509)

*基金项目:陕西省重点研发计划项目-社会发展领域[2019SF-062]。

第一作者:杨静,大学本科,药士,主要从事药品微生物检验与分析工作,(电子信箱)724862056@qq.com。

△通信作者:杨晓莉,女,硕士研究生,副主任药师,主要从事药品微生物控制与管理及标准修订工作,(电子信箱)yangxiaoli0206@163.com。

均购自国药集团化学试剂有限公司;蔗糖(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号为20170510)。

仪器:Aqualab4TE型水分活度仪(美国Decagon公司);HFSAFE1200LC型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);SX-500型蒸汽灭菌器(YOMY);LRH-250F型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);PL202-S型电子天平(瑞士梅特勒公司, $d=0.01\text{ g}$);厌氧产气包(Mitsubishi Gas Chemical CO., INC. 批号为8089ZJ-1)。

1.2 方法

梭菌增菌培养基配制:分别用氯化钠、蔗糖、丙三醇调节梭菌增菌培养基,灭菌后测量 A_w ^[14-15],使其 A_w 值为0.90~0.98,同时配制不调 A_w 的梭菌增菌培养基,作为 T_0 。

菌液制备:开启生孢梭菌菌种,将3代微球菌转接至12 mL 硫乙醇酸盐流体培养基,30~35℃培养24 h,用无菌生理盐水稀释成每1 mL含 10^4 cfu菌落数的菌悬液。

接种:取制备好的新鲜菌悬液0.3 mL,加入上述梭菌增菌培养基30 mL中,混匀,其中 T_0 为对照组,其余均为试验组。

培养:将各组试验管置厌氧培养袋中,35℃培养,分别于0,4,6,18,24,48,72,96,120 h时间点,取1 mL稀释至适宜的稀释级接种平皿(直径90 mm),注入温度不超过45℃哥伦比亚琼脂培养基约20 mL,待培养基凝固后装入厌氧培养袋,于35℃厌氧培养72 h,计数。

绘制生长速率曲线:不同介质在获得生孢梭菌生长所需最低 A_w 后,选择最低 A_w 附近的3个水平,即低于 A_w 限值0.01单位 T_L ,高于 A_w 限值0.01单位 T_H 分别进行重复3次试验,以测得的菌落数(cfu)的对数值,对时间(h)作图,绘制生长速率曲线。

2 结果

2.1 氯化钠培养基下生孢梭菌所需最低 A_w

以氯化钠调节梭菌增菌培养基 A_w ,测定在4种不同 A_w (0.94,0.95,0.96,0.97)下生孢梭菌的生长速率。3次重复试验结果均显示, A_w 值为0.94时,生孢梭菌不生长;比较3次试验结果,第3次试验结果显示,

A_w 值为0.95时,生孢梭菌出现缓慢生长迹象(图1); $A_w \geq 0.96$ 时,生孢梭菌可正常生长。可见,以氯化钠调节梭菌增菌液的 A_w ,生孢梭菌生长所需的最低 A_w 范围为0.95~0.96。另外,由生长速率曲线可见,生孢梭菌一般在培养24 h后进入对数生长期,在培养48 h后可达到生长稳定期。

2.2 蔗糖培养基下生孢梭菌所需最低 A_w

以蔗糖调节梭菌增菌培养基 A_w ,测定在4种不同 A_w (0.94,0.95,0.96,0.99)下生孢梭菌的生长速率。3次重复试验结果均显示, A_w 为0.94时,生孢梭菌不生长(图2); A_w 为0.95时,生孢梭菌出现缓慢生长迹象; $A_w \geq 0.96$ 时,生孢梭菌可正常生长。可见,以蔗糖调节梭菌增菌液的 A_w ,生孢梭菌生长所需的最低 A_w 范围为0.95~0.96。

2.3 甘油培养基下生孢梭菌所需最低 A_w

以甘油调节梭菌增菌培养基 A_w ,测定在3种不同 A_w (0.91,0.92,0.93)下生孢梭菌的生长速率。3次重复试验结果均显示, A_w 为0.91时,生孢梭菌不生长(图3); $A_w \geq 0.92$ 时,生孢梭菌可正常生长。可见,以甘油调节梭菌增菌液的水分活度,生孢梭菌生长所需的最低 A_w 为0.92。

3 讨论

生孢梭菌是严格厌氧菌,菌龄、培养基、培养条件对试验结果的影响非常大,每次试验都必须制备新鲜菌种,保证菌龄及菌的活性;梭菌增菌液培养基主要是琼脂和半胱氨酸,起到保证培养基体系厌氧环境的作用,随着时间的增长,体系的还原物质会被消耗,这使得0 h刚加入的菌的存活率受到威胁,故每次试验都必须采用新鲜配制的培养基;培养条件采用厌氧培养袋,每个时间节点进行计数的同时,对厌氧环境有更高要求,也会对试验结果的稳定性产生影响,针对该项问题,快速试验,尽可能每个时间点重新放置厌氧产气袋,保证厌氧培养条件;不同的介质,生孢梭菌生长所需最低 A_w 不同,其中甘油的试验结果相对稳定,生孢梭菌生长所需最低 A_w 最低,尤其在0 h时,同样的接菌量,甘油测得的菌落数常高于蔗糖和氯化钠,有时甚至高于对照组,

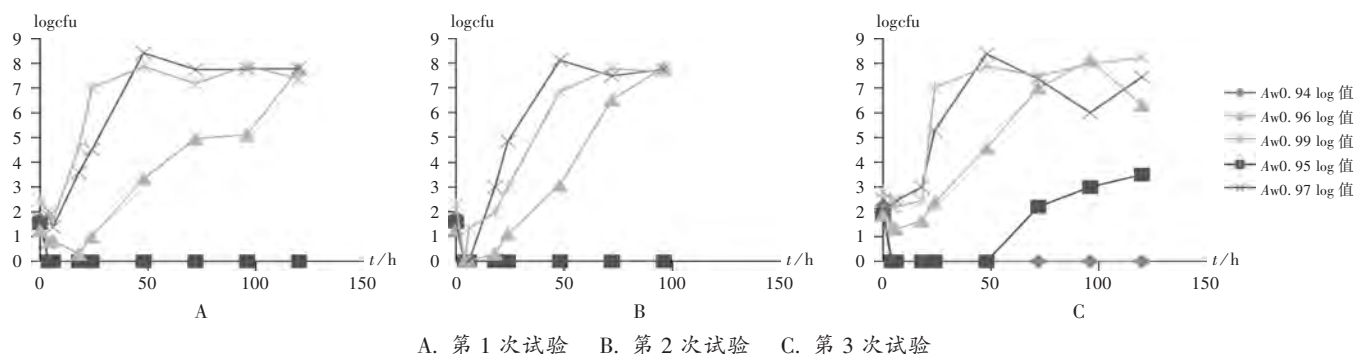
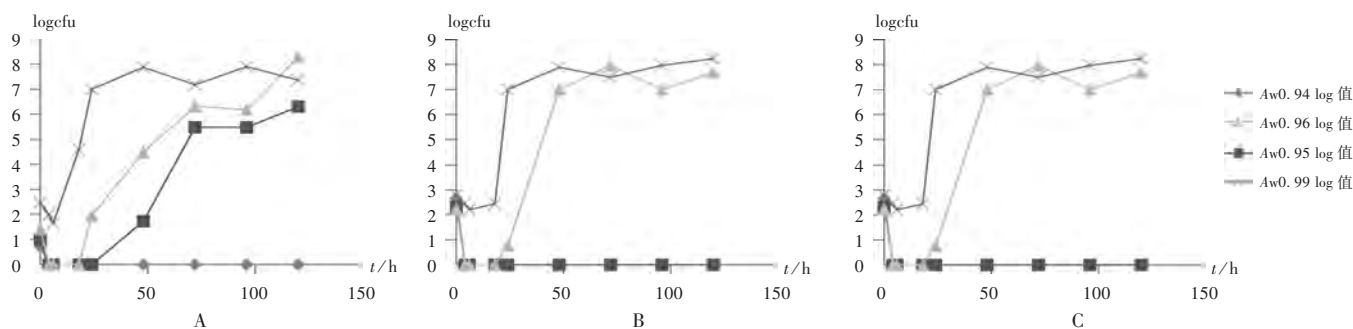
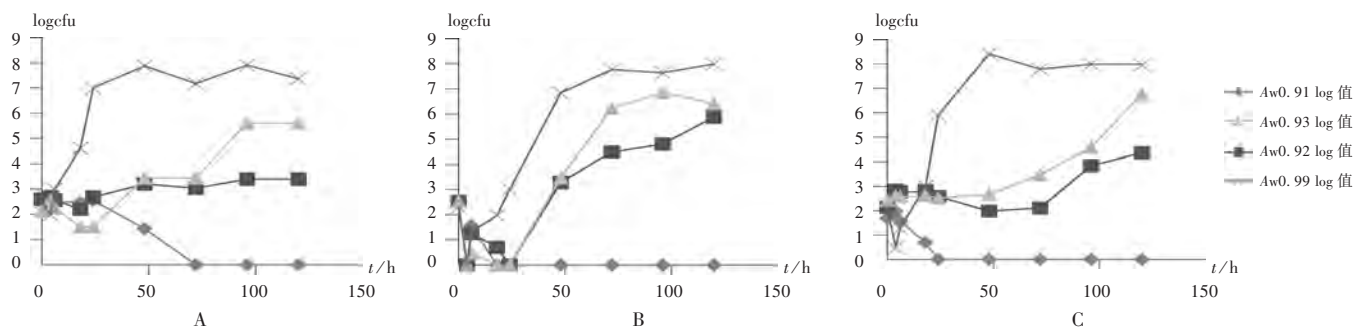


图1 氯化钠培养基下生孢梭菌生长所需最低水分活度



A. 第 1 次试验 B. 第 2 次试验 C. 第 3 次试验
图 2 蔗糖培养介质下生孢梭菌生长所需最低水分活度



A. 第 1 次试验 B. 第 2 次试验 C. 第 3 次试验
图 3 甘油培养介质下生孢梭菌生长所需最低水分活度

甘油本身有助于厌氧条件的保存。

2015 年版《中国药典(四部)》中,生孢梭菌在阴道、尿道及固体局部给予非无菌制剂中被列为控制菌^[7],故本研究对于制药产品研发、生产环境控制、包装材料选择及药品成品贮存及日常微生物限度检查均有价值^[16]。与在制药工业中广泛采用的水含量的物理意义相比, A_w 更有助于理解制药产品的相关领域的科学内涵。《美国药典》《欧洲药典》已意识到了 A_w 及其应用的重要性,先后推出了 A_w 规定。故建议建立合理微生物相关 A_w 控制策略,从而进一步推动我国微生物控制的发展。

参考文献:

- [1] 杨晓莉,李 辉,绳金房,等. 药品微生物控制中水分活度测定的应用前景[J]. 中国药业,2018,27(23):1-4.
- [2] 绳金房,李 辉,马仕洪,等. 浅析水分活度测定在非无菌制剂微生物控制中的应用[J]. 药物分析杂志,2018,38(10):1837-1841.
- [3] LABUZA TP. Properties of Water as Related to the Keeping Quality of Foods[C]//Proceedings 3rd International Conference on Food Science and Technology. Washington, DC. Institute of Food Technologists. 1970:618.
- [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):1747-1751.
- [5] The United States Pharmacopieial Convention. USP 29 - NF 24 (Second Supplement) [M]. Rockville: The United States Pharmacopieial Convention,2006:3802-3803.
- [6] 杨晓莉,李辉,马英英,等. 中国药典 2015 年版非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法解读[J]. 药物分析杂志,2016,36(3):1101-1107.

- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部) [M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:145-148.

- [8] The United States Pharmacopieial Convention. USP 40 - NF35[M]. Rockville: The United States Pharmacopieial Convention, 2017: 1416-1418.

- [9] FRIESEL RR. The application of water activity(a_w) measurement to the microbiological attributes testing of raw materials used in the manufacture of non - sterile pharmaceutical products[J]. Pharmacoepieal Forum,1999,25(6):8974.

- [10] United States Pharmacopieial 41 th Edition[M]. Application of water activity determination to nonsterile Pharmacopieial products,2018:7298-7300.

- [11] NIETO MB, TOLEDO RT. Fate of Clostridium sporogenes PA 3679 in Fish Sausage formulations with Adjusted a, using Food Binders, Urnal of Food Science, 1989,54(5):1129.

- [12] BULL MK, OLIVIER SA, R. J. VAN DIEPENBEEK, F. KORMELINK, AND B. CHAPMAN. 2009. Synergistic inactivation of spores of proteolytic Clostridium botulinum strains by high pressure and heat is strain and product dependent[J]. Appl. Environ. Microbiol,2009,75:434-445.

- [13] R. H. TAYLOR, M. L. Dunn, Conditions associated with Clostridium sporogenes growth as a surrogate for Clostridium botulinum in nonthermally processed canned butter[J]. Journal of Dairy Science,2013,96(5):2754-2764.

- [14] GB 9695. 12-1988, 肉与肉制品水分活度测定[S].

- [15] GB5009. 238-2016, 食品安全国家标准食品水分活度的测定[S].

- [16] 聂少勇. 水活度测定及其在制药工业的应用[J]. 中国医药工业杂志,2018,49(12):1710-1715.

(收稿日期:2019-09-08)