

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.21.014

水分活度对黑根霉生长的影响

王杠杠, 王似锦, 马仕洪[△]

(中国食品药品检定研究院·化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 100050)

摘要:目的 探讨不同调节剂作用下黑根霉的最低生长水分活度(A_w), 以及对其生长的影响。方法 以氯化钠、甘油、蔗糖为调节剂, 配制系列 A_w 不同的沙氏葡萄糖琼脂培养基, 将黑根霉菌落转移至培养基上, 22.5 °C 温度下培养 21 d, 每天测量菌落直径, 观察菌落变化。结果 氯化钠组 $A_w < 0.93$ 时, 黑根霉无生长迹象; 甘油组 $A_w < 0.87$ 时, 黑根霉无生长迹象, $A_w < 0.89$ 时不能产孢; 蔗糖组 $A_w < 0.86$ 时, 黑根霉无生长迹象, $A_w < 0.88$ 时不能产孢。随着 A_w 的降低, 黑根霉开始生长时间、产孢时间均推迟, 黑根霉的生长速率下降。结论 黑根霉在不同调节剂作用下最低生长 A_w 分别为 0.93(氯化钠)、0.87(甘油)、0.86(蔗糖)。不同调节剂种类对黑根霉最低生长 A_w 有较大影响。

关键词:黑根霉; 水分活度; 生长曲线; 质量控制

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2022)21-0060-03

Effect of Water Activity on Growth of *Rhizopus Nigricans*

WANG Ganggang, WANG Sijin, MA Shihong

(National Institutes for Food and Drug Control · Key Laboratory of Research and Evaluation of Chemical Drug Quality, Beijing, China 100050)

Abstract: Objective To investigate the minimum water activity (A_w) required to support the growth of *Rhizopus nigricans* under the different regulators, and the effect of which on its growth. **Methods** The sodium chloride, glycerin and sucrose were used as the regulators to prepare a series of Sabouraud dextrose agar (SDA) medium with the different A_w . The colonies of *Rhizopus nigricans* were inoculated on the SDA medium and cultured at 22.5 °C for 21 d. The diameters of colonies were measured and the changes of colonies were observed every day. **Results** In the sodium chloride group, *Rhizopus nigricans* could not grow when the $A_w < 0.93$. In the glycerin group, *Rhizopus nigricans* could not grow when the $A_w < 0.87$, and it could not sporulate when the $A_w < 0.89$. In the sucrose group, *Rhizopus nigricans* could not grow when the $A_w < 0.86$, and it could not sporulate when the $A_w < 0.88$. With the decrease of A_w , the beginning growth time and sporulation time of *Rhizopus nigricans* all delayed, and the growth rate of *Rhizopus nigricans* decreased. **Conclusion** The minimum A_w required to support the growth of *Rhizopus nigricans* under the different regulators is 0.93 (sodium chloride), 0.87 (glycerin), 0.86 (sucrose), and the different types of regulators have a great influence on the minimum A_w required to support the growth of *Rhizopus nigricans*.

Key words: *Rhizopus nigricans*; water activity; growth curve; quality control

水分活度(A_w)对于评价药品中微生物污染和增殖的风险具有重要意义^[1-4]。 A_w 是指在相同温度下, 产品的蒸气压与纯水的蒸气压的比值乘以 100, 即为等效相对湿度^[5]。1957年, 澳大利亚科学家 SCOTT 提出影响微生物生长的是 A_w 而非水分含量, 每种微生物都存在最低生长 A_w , 低于该限值微生物将不能生长^[6]。20世纪 80 年代, 美国食品药品监督管理局(FDA)在食品生产中采用 A_w 检测对微生物进行控制, 《美国药典》(USP)第 29 版也于 2006 年 8 月正式颁布 < 1112 > A_w 测定在非无菌药品上的应用, 指出测量非无菌药品的 A_w 有助于优化处方, 提高防腐体系的抑菌效果, 降低处方(尤其是液体、膏、乳液和霜)受微生物污染的风险, 并收录了代表微生物的最低生长 A_w ^[7]。近年来, 国内报道了部分制药行业代表性微生物生长所需的最低 A_w ^[8-12]。黑根霉(*Rhizopus stolonifer*, 曾用名 *Rhizopus nigricans*)又名匍枝根霉, 是导致物质腐烂变质的常见污染菌。20世纪 40 年

代, 有学者研究了环境湿度对黑根霉孢子萌发的影响^[13]。USP < 1112 > 中收录的黑根霉最低生长 A_w 为 0.93, 但黑根霉在低于该 A_w 的条件下仍可生长^[14-15]。为验证 USP < 1112 > 中收录的黑根霉最低 A_w 的准确性, 本研究选取 1 株黑根霉标准菌株作为研究对象, 分别于氯化钠、甘油、蔗糖调节的不同 A_w 条件下培养, 并观察菌落变化, 分析不同调节剂作用下 A_w 对黑根霉生长的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株: 黑根霉(*Rhizopus stolonifer*) CGMCC 3.10。

试剂与培养基: 氯化钠(美国 Sigma 公司, 批号为 SZBE0490V); 甘油(国药集团化学试剂有限公司, 批号为 20180401); 蔗糖(北京糖业烟酒集团有限公司, 批号为 20181011); 沙氏葡萄糖琼脂(SDA)培养基(美国 BD 公司, 批号为 7135844); S-Pak 滤膜(美国 Millipore 公

第一作者: 王杠杠, 女, 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向为药品微生物检验与控制, (电子信箱) wangganggang@nifdc.org.cn。

[△]通信作者: 马仕洪, 男, 硕士研究生, 主任药师, 研究方向为药品微生物检验与控制, (电子信箱) mash@nifdc.org.cn。

司,批号为F7EA83802)。

仪器: Aqualab 4TE Duo型水分活度测定仪(Decagon Devices公司,准确度为 ± 0.003); BJ-2202S型电子天平(德国赛多利斯公司,精度为0.01 g); NU-534-400S型生物安全柜(Nuaire公司); INC821C复合型低温恒温培养箱(Yamato公司)。

1.2 方法

培养基制备:以氯化钠、甘油、蔗糖为调节剂,配制一系列不同 A_w 梯度的SDA培养基,灭菌,待培养基冷却凝固,测量温度为25℃时的 A_w 。参考USP<1112>表1^[7]中黑根霉最低生长 A_w ,调节SDA培养基最高 A_w 为0.94,向下每个 A_w 梯度相差0.01。同时配制不加调节剂的SDA培养基作为对照组(control)。

孢子悬液制备与预培养:按2020年版《中国药典(四部)》^[16]要求,制备 10^4 cfu/mL的黑根霉孢子悬液。无菌操作,将滤膜正面朝上,贴于未调节 A_w 的SDA培养基上,取2.5 μ L孢子悬液点植于滤膜中心位置,22.5℃温度下预培养24 h。

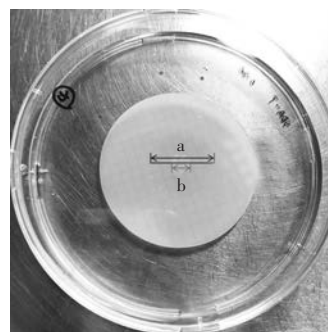
转移及观察:测量并记录预培养后的菌落直径,作为初始大小。将菌落连同滤膜转移至制备好的不同梯度 A_w 的SDA培养基上,置用甘油调节的相同 A_w 环境的密闭容器中,22.5℃温度下培养21 d,每天测量菌落直径(垂直测量2次,取平均值),观察并记录菌落变化。以菌落直径增长(mm)对培养时间(d)作线性图,绘制黑根霉菌落生长曲线。

2 结果

2.1 黑根霉最低生长 A_w

黑根霉在氯化钠、甘油、蔗糖调节的不同 A_w 条件下的生长曲线见图1。氯化钠组, $A_w < 0.93$ 时黑根霉无生长迹象; $A_w = 0.94, 0.93$ 时,培养1 d菌落直径有小幅增加,可能原因是滤膜转移时带有少量原培养基,为黑根霉生长提供养分,故时间不能作为该 A_w 条件下的开始生长时间。菌落直径自第2天停止增长,持续一段时间后再继续增长,此时黑根霉生长养分来源为转移后的培养基,为该 A_w 条件下的开始生长时间。甘油组与蔗糖组,在 A_w 较低时,黑根霉由原菌落中心部位

开始生长,并非由原菌落菌丝直接向外扩张,故生长早期菌落直径无变化。甘油组, $A_w < 0.87$ 时黑根霉无生长迹象。蔗糖组, $A_w < 0.86$ 时黑根霉无生长迹象; $A_w = 0.87, 0.86$ 时,肉眼可见有生长活动,但生长菌落未超过原有菌落范围,故直径增长计为0(图2)。由此得到不同调节剂作用下黑根霉最低生长 A_w ,氯化钠组为0.93,甘油组为0.87,蔗糖组为0.86。与氯化钠相比,以甘油和蔗糖作为调节剂时,黑根霉可在更低 A_w 条件下生长。



a. 原菌落直径 b. 生长菌落直径

图2 黑根霉在蔗糖调节的SDA培养基($A_w = 0.86$)中生长21 d
a. Diameter of colony before the growth b. Diameter of colony after the growth

Fig. 2 Growth of *Rhizopus nigricans* in SDA medium ($A_w = 0.86$) regulated by sucrose for 21 d

2.2 A_w 对黑根霉生长的影响

高于最低生长 A_w 的条件下,黑根霉经过一段时间的停滞期后,菌落直径基本呈直线增长,直至长满培养皿或试验结束。以开始生长时间(d)、产孢时间(d)、生长速率(mm/d)为指标,评价 A_w 对黑根霉生长的影响。黑根霉不同 A_w 条件下的开始生长时间及产孢时间见表1。可见,随着 A_w 的下降,黑根霉开始生长时间、产孢时间均推迟; A_w 较高时,黑根霉通常于开始生长后第2~3天产孢; A_w 越低,产孢时间较开始生长时间推迟越多, A_w 低于一定程度时黑根霉不能产孢。甘油作为调节剂时, $A_w < 0.89$ 时黑根霉不能产孢;蔗糖作为调节剂时, $A_w < 0.88$ 黑根霉不能产孢。

取生长曲线开始生长后的部分进行线性拟合,所得斜率即为该生长条件下黑根霉的生长速率(mm/d)。

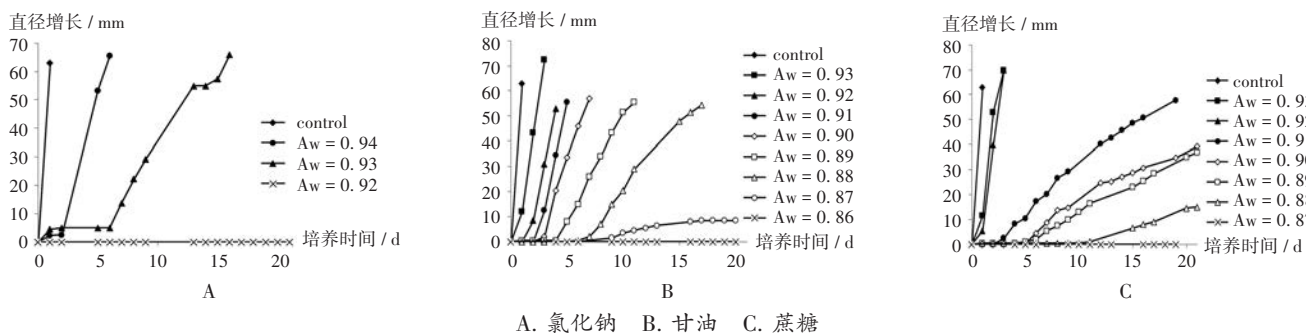


图1 氯化钠、甘油、蔗糖调节的不同 A_w 条件下黑根霉生长曲线

A. Sodium chloride B. Glycerin C. Sucrose

Fig. 1 Growth curves of *Rhizopus nigricans* under different A_w regulated by sodium chloride, glycerin and sucrose

表1 不同Aw条件下黑根霉开始生长时间和产孢时间

Tab.1 Beginning growth time and sporulation time of *Rhizopus nigricans* under different Aw

Aw调节剂	Aw	开始生长时间(d)	产孢时间(d)	Aw调节剂	Aw	开始生长时间(d)	产孢时间(d)	
氯化钠	0.94	1	3	蔗糖	0.93	1	2	
	0.93	3	5		0.92	1	2	
	甘油	0.93	1		2	0.91	2	5
		0.92	2		3	0.90	2	6
		0.91	3		4	0.89	3	6
		0.90	3		4	0.88	4	8
		0.89	3		6	0.87	6	
		0.88	4			0.86	12	
0.87	5							

由图3可见,氯化钠组生长速率在7~63 mm/d之间,甘油组与蔗糖组生长速率在1~63 mm/d之间。不同调节剂作用下、Aw对生长速率的影响基本一致,随Aw的降低而下降。氯化钠组和甘油组Aw与生长速率大致呈线性关系。蔗糖组在Aw = 0.91时曲线出现明显拐点, Aw < 0.91时Aw对黑根霉生长速率的影响减弱。

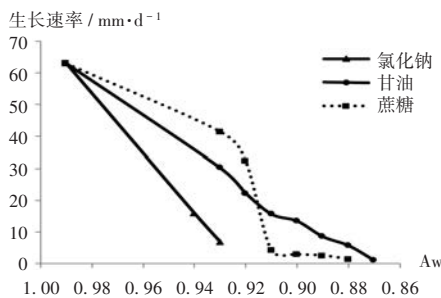


图3 Aw对黑根霉生长速率的影响

Fig.3 Effect of Aw on the growth rate of *Rhizopus nigricans*

3 讨论

图1及图3显示,随着Aw的降低,黑根霉开始生长时间、产孢时间均推迟,生长速率下降;黑根霉在不同调节剂作用下最低生长Aw分别为0.93(氯化钠)、0.87(甘油)、0.86(蔗糖),差异明显。其中,氯化钠组结果与USP < 1112 > 结果一致,甘油组及蔗糖组结果更低。

USP < 1112 > 结果源自1949年SNOW^[13]的研究,其研究对象为环境分离菌株,培养基为浸泡过啤酒麦芽汁的明胶,干燥后接种黑根霉孢子,置用硫酸溶液调节的不同湿度的25℃密闭环境中培养,显微镜下观察孢子的萌发情况。与本研究中所使用的判断是否生长的标准及调节Aw的方式有区别。

2011年,AMIRI等^[15]报道了在使用氯化钠调节培养基Aw的条件下,黑根霉孢子萌发所需Aw(最低为0.908)低于菌丝生长Aw(最低为0.936),与本研究氯化钠组的结果一致。HOCKING等^[14]使用葡萄糖和果糖调节培养基Aw,得到的黑根霉孢子萌发最低Aw为0.84。考虑菌丝萌发需要Aw环境更高,认为与本研究

中蔗糖组的结果基本一致。

SNOW^[13]通过调节环境湿度来调节Aw的方式,在实际产品生产及储存过程中需要较长的平衡过程。在食品及制药工业中,通常通过控制处方及工艺调节产品Aw,本研究中采用直接添加调节剂至培养基中,更贴近产品生产及储存的实际情况,对于控制黑根霉污染、防止产品腐烂变质更有参考意义。且Aw调节剂种类对黑根霉生长有较大影响,提醒生产企业在选择添加不同种类的Aw调节剂时应设定不同Aw标准,以更有效地降低药品微生物污染风险。

参考文献

- [1] 杨晓莉,李辉,许华玉,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(33):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,2018,33(10):1837-1841.
- [3] 王似锦,余萌,王杠杠,等. 非无菌药品中不可接受微生物的控制与风险评估[J]. 中国药事,2020,34(9):1028-1039.
- [4] 王似锦,王杠杠,蔡春燕,等. 双联活菌胶囊在不同水分活度条件下的活菌数变化[J]. 中国微生物学杂志,2021,33(4):412-415.
- [5] ISO 18787:2017(E), Foodstuffs - Determination of water activity[S].
- [6] SCOTT WJ. Water relations of food spoilage microorganisms[J]. Adv Food Res, 1957, 7:83-127.
- [7] The United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopeia 43rd Edition[M]. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2020:7820-7823.
- [8] 周志云,杨静,李翠,等. 黑曲霉生长最低水分活度研究[J]. 中国药业,2020,29(17):60-63.
- [9] 杨静,李翠,周志云,等. 生孢梭菌生长所需最低水分活度研究[J]. 中国药业,2020,29(7):102-104.
- [10] 王似锦,任文鑫,高安成,等. 大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的最低生长水分活度测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020,11(9):2946-2951.
- [11] 易巧,熊骏,刘绪平. 枯草芽孢杆菌生长所需最低水分活度的考察与验证[J]. 中国药理学杂志,2021,56(6):497-501.
- [12] 王杠杠,王似锦,马仕洪. 水分活度对洋葱伯克霍尔德菌群生长的影响[J]. 微生物学杂志,2021,41(3):85-90.
- [13] SNOW D. The germination of mould spores at controlled humidities[J]. App Biol, 1949, 36(1):1-13.
- [14] HOCKING AD, MISCAMBLE BF. Water relations of some Zygomycetes isolated from food[J]. Mycol Res, 1995, 99(9):1113-1118.
- [15] AMIRI A, CHAI W, SCHNABEL G. Effect of nutrient status, pH, temperature and water potential on germination and growth of *Rhizopus stolonifer* and *Gilbertella persicaria* [J]. J Plant Pathol, 2011, 93(3):603-612.
- [16] 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, 2020:160.

(收稿日期:2022-01-28;修回日期:2022-06-22)