

大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的最低生长水分活度测定

王似锦¹, 任文鑫², 高安成², 马仕洪^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 10050; 2. 西安市食品药品检验所, 西安 710054)

摘 要: **目的** 探索大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的最低生长水分活度(water activity, A_w)。 **方法** 分别采用定性和定量试验, 研究在 NaCl、蔗糖、甘油 3 种水分活度调节剂作用下, 水分活度对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌生长规律的影响。 **结果** 大肠埃希菌的最低生长水分活度为 0.922~0.950, 金黄色葡萄球菌的最低生长水分活度为 0.864~0.900。根据对生长曲线的分析, 随着水分活度下降, 大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的总生长量降低, 停滞时间延长, 比生长速率下降。 **结论** 水分活度调节剂会影响细菌的最低生长水分活度, 大肠埃希菌对甘油更为耐受, 而金黄色葡萄球菌对氯化钠更为耐受。2 种菌的比生长速率呈线性下降规律, 且在氯化钠和蔗糖的比生长速率下降规律基本一致。

关键词: 水分活度; 大肠埃希菌; 金黄色葡萄球菌; 生长曲线

Determination of the minimum water activity for growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

WANG Si-Jin¹, REN Wen-Xin², GAO An-Cheng², MA Shi-Hong^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;
2. Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710054, China)

ABSTRACT: Objective To explore the minimum growth water activity (A_w) of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Methods** The effect of A_w on the growth of *E. coli* and *S. aureus* under the action of NaCl, sucrose and glycerin was studied by qualitative and quantitative tests. **Results** The minimum A_w for growth of *E. coli* was 0.922-0.950, and that of *Staphylococcus aureus* was 0.864-0.900. With the decrease of water activity, the total growth of *E. coli* and *S. aureus* decreased, the stagnation time prolonged, and the specific growth rate decreased, according to the analysis of growth curve. **Conclusions** Water activity regulator can affect the minimum levels of A_w for growth of microorganisms. *E. coli* is more tolerant to glycerol, while *S. aureus* is NaCl. The specific growth rate of the 2 microorganisms show a linear decline rule, and the decline rule is basically the same for the specific growth rate of NaCl and sucrose.

KEY WORDS: water activity; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; growth curve

基金项目: 2017 年国家药品标准提高项目(2017015)

Fund: Supported by Improvement of National Pharmaceutical Standards in 2017(2017015)

*通讯作者: 马仕洪, 主任药师, 主要研究方向为药物分析。E-mail: mash@nifdc.org.cn

*Corresponding author: MA Shi-Hong, Director Pharmacist, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: mash@nifdc.org.cn

1 引言

水分活度(water activity, A_w)的概念是由澳大利亚科学家 Scott 于 1957 年提出^[1], 定义为溶液(或样品)中水蒸气分压与同温度下纯水的蒸气压之比。目前更为科学的说法是: 水分活度是某系统内水的能量状态连续体的表征。其实质是结合水含量越高(水分活度越低), 则水的能量越低, 结果是可用于化学反应、物理变化以及微生物生长繁殖的水越少^[2]。

一般而言, 溶质溶解会降低溶液(或样品)的水蒸气分压, 使水分活度降低, 一些降低作用比较明显的溶质被称为水分活度调节剂^[3]。与水分含量相比, 样品的水分活度更能够表示微生物生长的关系: 随着水分活度降低, 微生物的生长逐渐受到抑制直至不能生长。能够支持微生物生长的最低水分活度称之为最低生长水分活度或水分活度限值(water activity limit)^[2,3]。

水分活度概念自被提出以来, 在食品工艺、食品保藏和食品货架期预测等领域的研究和应用有很多。但是在药品质量控制方面, 特别是微生物污染控制方面的研究和应用相对较少^[2]。美国药典在水分活度测定在非无菌药品中的应用章节中提出^[4], 水分活度影响药品处方抑菌体系的抑菌有效性、药品处方中易于化学水解的活性药物成分的降解、处方易受微生物污染的程度, 并可以根据药品水分活度的情况, 适当地减少微生物限度检查的频次。人用药品注册技术要求国际协调会在其技术指导原则 Q6A^[5](质量标准: 新原料药和新药制剂的检测方法和认可限度: 化学物质)需要在原料药、辅料和非无菌药品的微生物限度检查的决策树中提出, 如果有科学的证据表明药品有抑菌作用或不能支持微生物生长, 则可降低微生物限度检查的频次。其中干燥的药品如口服固体制剂或粉末就是典型的不能支持微生物生长的例子, 但是应有足够的证据证明, 因此微生物的最低生长水分活度就是一个有力的证据^[6-8]。

已有相关研究和报道表明微生物在不同水分活度的培养基和食品中有不同的生长情况^[9-13], 但是, 在药典培养体系中常用的非选择性液体培养基胰酪大豆胨液体培养基中的生长情况目前鲜少报道。因此, 本研究选取食品和药品中经常污染细菌的代表, 也是微生物检验中典型的 2 种致病菌^[14]: 革兰氏阴性杆菌大肠埃希菌和革兰氏阳性球菌金黄色葡萄球菌的标准菌株, 分别研究这 2 种微生物在不同水分活度的胰酪大豆胨液体培养基中的生长情况(使用 3 种水分活度调节剂: 氯化钠、蔗糖和甘油), 并绘制 2 种菌在不同条件下的生长曲线, 研究水分活度的降低对 2 种菌生长的影响, 并确定这 2 种微生物的最低生长水分活度, 为药品的微生物控制提供新的解决方案, 并提供数据支持。

2 材料与方法

2.1 菌种

大肠埃希菌[CMCC(B) 44102]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B) 26003](中国医学细菌保藏管理中心)。

2.2 培养基和试剂

胰酪大豆胨琼脂培养基(soybean-casein digest agar, TSA)、胰酪大豆胨液体培养基(soybean-casein digest broth, TSB)(美国 BD 公司); 氯化钠、甘油(分析纯, 国药集团); 蔗糖(食品级, 北京糖业公司)。

2.3 仪器与设备

AquaLab Series 4TEV 台式水活度仪(美国 Decagon 公司); BD240 培养箱(德国 Binder 公司); BT224S 型分析天平(德国 Sartorius 公司); Forma classII A2 型生物安全柜(美国 Thermo 公司)。

2.4 实验方法

2.4.1 不同水分活度培养基的制备

配制 TSB 培养基, 并分别加入一定量的氯化钠、甘油和蔗糖, 121 °C 15 min 灭菌, 并测定其水分活度, 制备不同水分活度的 TSB 培养基。

2.4.2 菌种的活化和菌液的制备

将冷冻干燥的标准储备菌种划线至 TSA 培养基, 33 °C 培养 24 h, 将新鲜培养物接种至 10 mL TSB 中 33 °C 培养 24 h, 使用无菌 0.9% 氯化钠溶液将 TSB 培养物进行 10 倍系列稀释, 制备一定浓度的菌悬液。

2.4.3 不同水分活度培养基中的生长情况(定性试验)

配制水分活度范围在 0.900~0.960, 梯度为 0.004 的一系列 TSB 10 mL, 接种大肠埃希菌菌液, 接种量为 10~100 CFU/mL。于 35 °C 培养 10 d, 观察生长情况。同样地, 配制水分活度范围为 0.860~0.900, 梯度为 0.004 的一系列 TSB 10 mL, 接种金黄色葡萄球菌, 接种量 10~100 CFU/mL。于 35 °C 培养 30 d, 观察生长情况, 目测浑浊表示细菌生长, 目测澄清表示细菌不生长, 目测浑浊的管中, 水分活度最低的即为最低生长水分活度。。

2.4.4 不同水分活度培养基中的生长情况(定量试验, 生长曲线的测定)

同 2.4.3 的方法配制系列 TSB 100 mL, 并以未调节水分活度的 TSB 为对照(水分活度值为 0.995), 分别接种大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌, 接种量为 30~100 CFU/mL。于 35 °C 培养, 并于培养时间 0、1、2、3、4、5、6、12、18、24、36 h, 2、3、4、5、7、10 d 等时间点, 吸取培养液, 用 TSA 倾注平皿法计数, 以培养时间为横坐标, 以菌落计数结果的对数值为纵坐标, 绘制生长曲线。

3 结果与分析

3.1 定性试验结果

在不同水分活度调节剂作用下, 大肠埃希菌与金黄色葡萄球菌的最低水分活度值见表 1。大肠埃希菌生长的最低水分活度在 0.92~0.95 之间, 金黄色葡萄球菌在 0.86~0.90 之间。

结果表明, 作为水分活度调节剂, NaCl 和蔗糖的效果相似, 而二者与甘油的效果存在差异, 而且对 2 种菌的影响是相反的: 大肠埃希菌(革兰氏阴性杆菌): 氯化钠高(0.950), 甘油低(0.922); 金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性球菌): 氯化钠低(0.876), 甘油高(0.900)。这与之前的文献报道^[13]一致: 氯化钠和甘油对细菌生长的抑制作用存在差异, 且对革兰氏阴性杆菌和革兰氏阳性球菌的影响相反。在相同的水分活度条件下, 甘油对革兰氏阳性球菌对的抑制作用强于氯化钠。

表 1 最低水分活度结果
Table 1 Minimum levels of A_w growth

菌种	NaCl	甘油	蔗糖
大肠埃希菌	0.950	0.922	0.942
金黄色葡萄球菌	0.876	0.900	0.864

3.2 定量试验(生长曲线)结果

大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌在不同调节剂调节的水分活度的 TSB 中的生长曲线见图 1~6。生长曲线的生长情况与定性试验的结果基本一致, 在低于一定水分活度情况下, 大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌不生长。

为了便于分析, 使用总生长量、停滞时间、比生长速率来描述不同水分活度条件下细菌的生长情况^[15,16]。

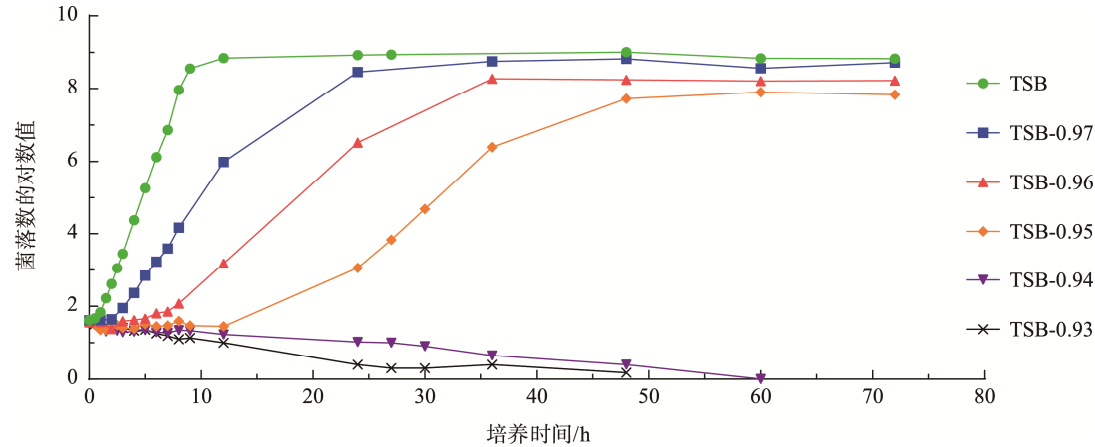


图 1 大肠埃希菌在 NaCl 调节水分活度的 TSB 中的生长曲线
Fig.1 Growth curve of *E. coli* in TSB with different A_w adjusted by NaCl

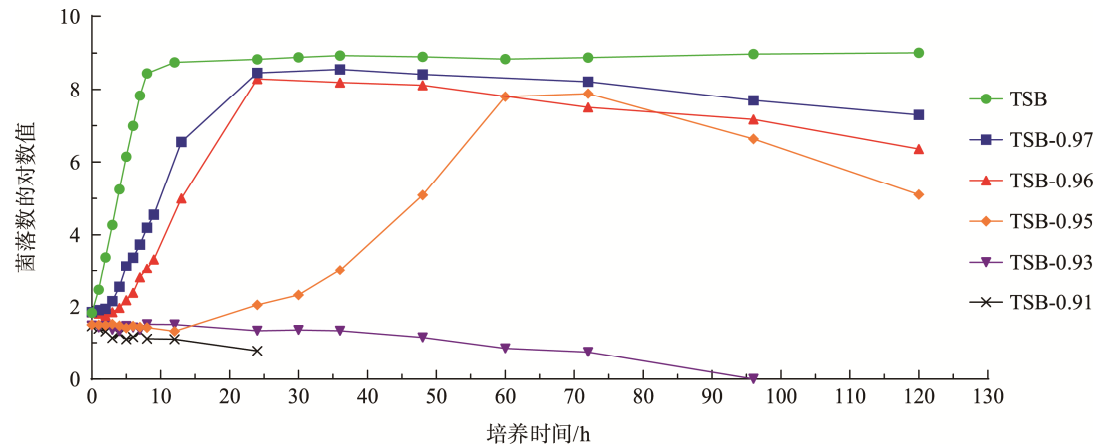


图 2 大肠埃希菌在蔗糖调节水分活度的 TSB 中的生长曲线
Fig.2 Growth curve of *E. coli* in TSB with different A_w adjusted by sucrose

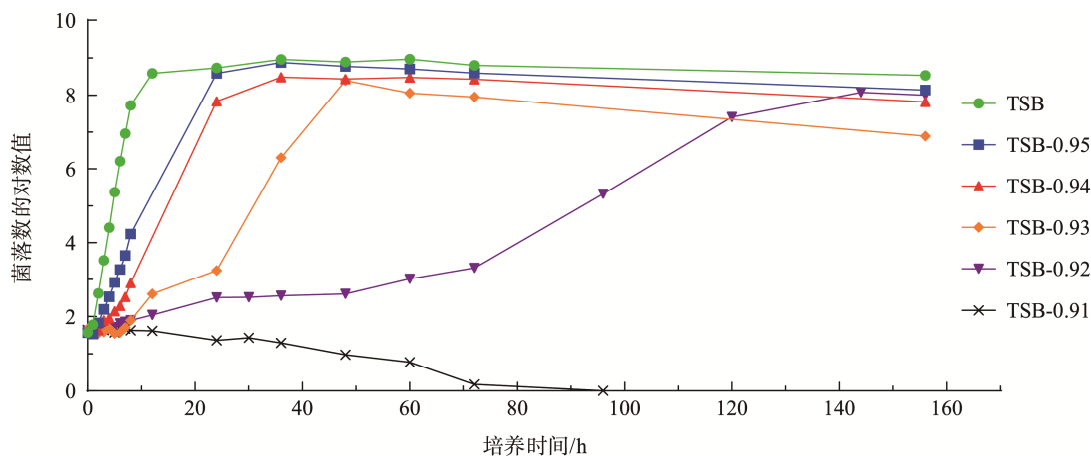


图 3 大肠埃希菌在甘油调节水分活度的 TSB 中的生长曲线

Fig.3 Growth curve of *E. coli* in TSB with different A_w adjusted by glycerin

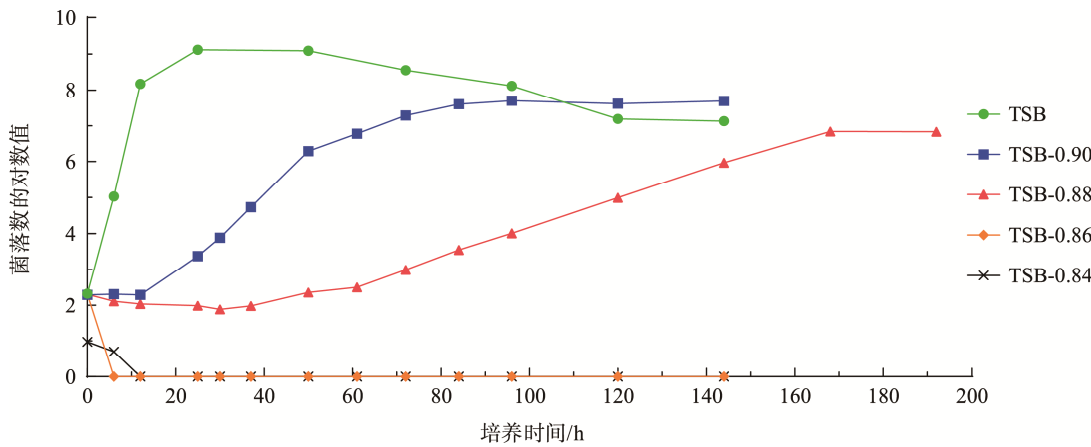


图 4 金黄色葡萄球菌在氯化钠调节水分活度的 TSB 中的生长曲线

Fig.4 Growth curve of *S. aureus* in TSB with different A_w adjusted by NaCl

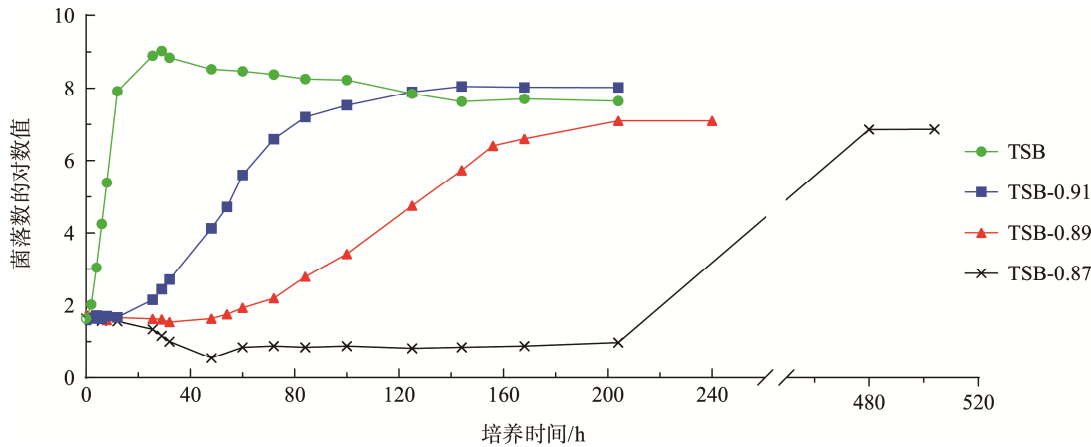


图 5 金黄色葡萄球菌在蔗糖调节水分活度的 TSB 中的生长曲线

Fig.5 Growth curve of *S. aureus* in TSB with different A_w adjusted by sucrose

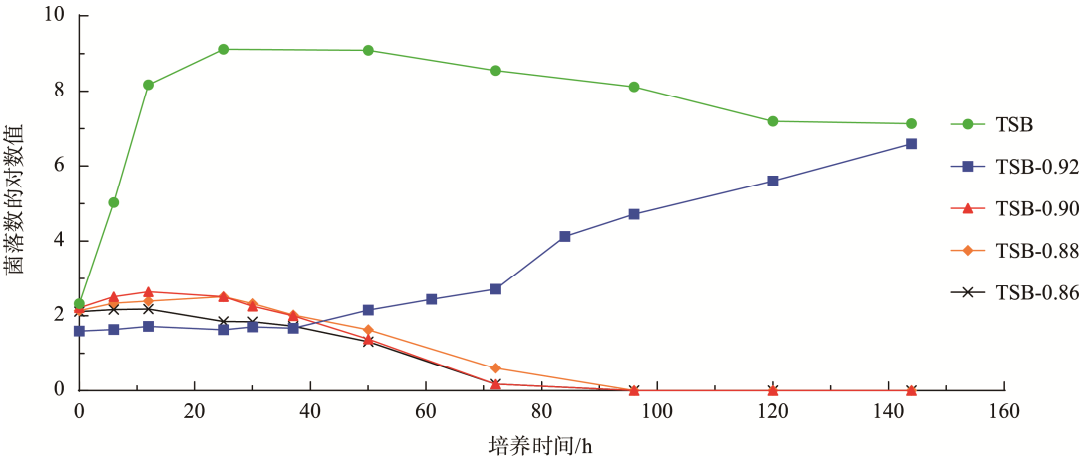


图 6 金黄色葡萄球菌在甘油调节水分活度的 TSB 中的生长曲线
Fig.6 Growth curve of *S. aureus* in TSB with different A_w adjusted by glycerin

大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的总生长量总体的规律是随着水分活度下降, 大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的总生长量降低, 直至不再生长繁殖, 结果见图 1~图 6。随水分活度降低, 2 种菌的停滞时间延长。氯化钠和蔗糖对大肠埃希菌的停滞时间的变化影响基本一致, 2 条曲线基本重合, 结果见图 7。在 0.995~0.92 的水分活度范围内, 同一水分活度条件下, 金黄色葡萄球菌的停滞时间最小的是甘油, 其次是蔗糖, 最大的是氯化钠, 结果见图 8。

随水分活度降低, 2 种菌的比生长速率降低, 其下降符合线性规律, 拟合直线的 r^2 均大于 0.90, 之前有研究也发现同样的规律^[1,3,17,18]。氯化钠和蔗糖对 2 种菌的比生长速率的变化影响基本一致, 特别是对于大肠埃希菌, 2 条直线基本重合, 结果见图 9~10。

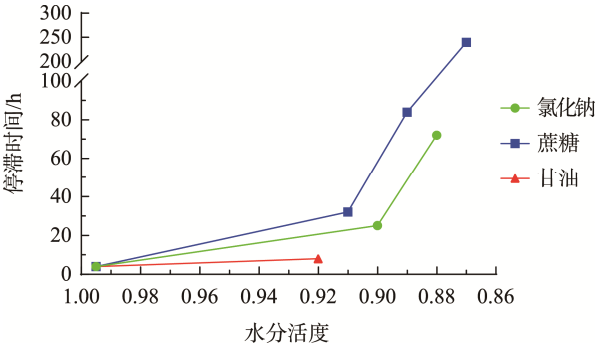


图 8 金黄色葡萄球菌在不同水分活度条件下的停滞时间
Fig.8 Lag phase of *S.aureus* in different A_w

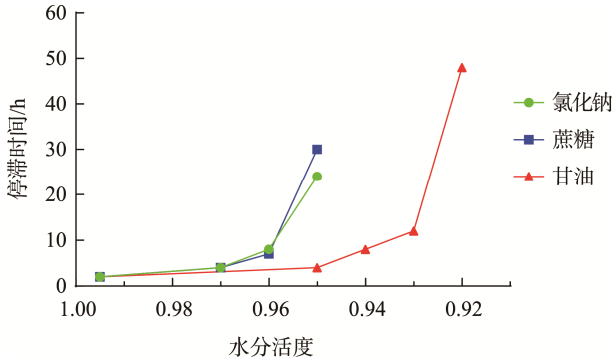


图 7 大肠埃希菌在不同水分活度条件下的停滞时间
Fig.7 Lag phase of *E.coli* in different A_w

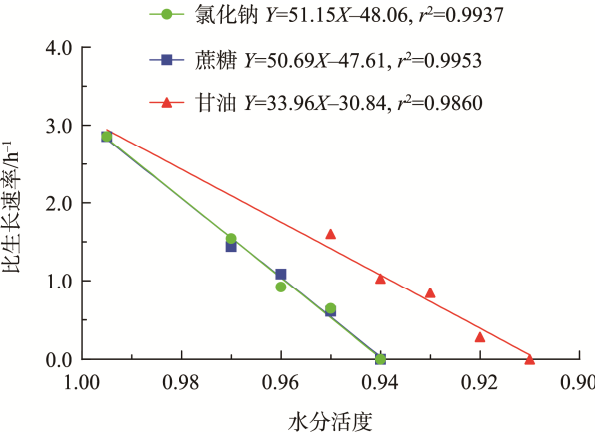


图 9 大肠埃希菌在不同水分活度条件下的比生长速率
Fig.9 Growth rate of *E.coli* in different A_w

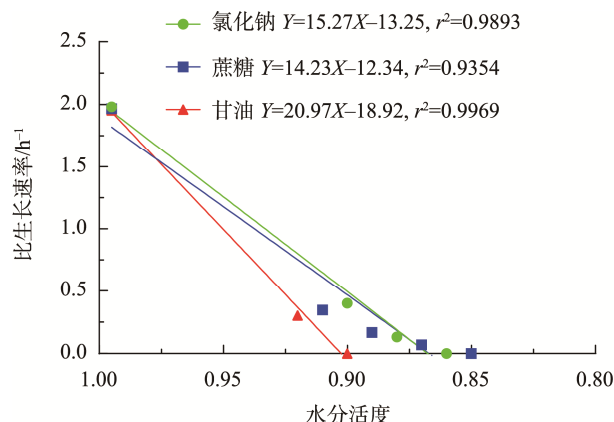


图10 金黄色葡萄球菌在不同水分活度条件下的比生长速率
Fig.10 Growth rate of *S.aureus* in different A_w

4 结论

本研究表明, 2 种水分活度调节剂(氯化钠和甘油)相比, 大肠埃希菌对甘油更为耐受, 而金黄色葡萄球菌对氯化钠更为耐受。Marshall 等研究^[13]表明, 在其他条件一致的情况下, 水分活度调节剂会影响到微生物的最低生长水分活度。

Cundell 等^[2,3]报道使用氯化钠为调节剂, 大肠埃希菌的最低生长水分活度为 0.95, 本研究为 0.950, 结果一致。但是, 影响微生物生长的因素包括温度、pH 值、营养条件以及水分活度等, 因此, 如果培养基、培养温度等因素不一致, 最低水分活度的具体数值会略有差异, Leggeri 等^[10]报道使用氯化钠为调节剂, 金黄色葡萄球菌的最低生长水分活度为 0.86, 而本研究为结果为 0.876。因此, 针对一些标准和文献中推荐的微生物最低生长水分活度值, 应看作是一定条件下得到的数据, 并不是绝对值, 在应用时仅可用于参考。

本研究表明, 以氯化钠、蔗糖和甘油为调节剂, 在 35 °C 条件下, 以胰酪大豆胨液体为培养基, 大肠埃希菌的最低生长水分活度在 0.922~0.950 之间, 金黄色葡萄球菌的最低生长水分活度在 0.864~0.900 之间。

根据对生长曲线的分析, 随着水分活度下降, 大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的总生长量降低, 停滞时间延长, 比生长速率下降^[15,16]。研究表明, 这 2 种菌的比生长速率呈线性下降规律, 且在氯化钠和蔗糖的比生长速率下降规律基本一致。

参考文献

- [1] Scott WJ. Water relations of food spoilage microorganisms [J]. Adv Food Res, 1957, 7: 83-127.
- [2] Cundell AM, Fontana AJ. Water activity applications in the pharmaceutical industry [M]. Richmond: Davis Healthcare International Publishing, 2009.
- [3] Troller JA, Christian JHB. Water activity and food [M]. Pittsburgh: Academic Press, 1978.
- [4] USP/NF 41 [S].
- [5] ICH Q6A Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new

drug substances and new drug products: Chemical substances [S].

- [6] 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.
Sheng JF, Li H, Ma SH, et al. Application of water activity determination of microbial control in nonsterile pharmaceutical products [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(10): 1837-1841.
- [7] 杨晓莉, 李辉, 徐华玉, 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(23): 1-4.
Yang XL, Li H, Xu HY, et al. Application prospect of water activity determination in microbial control of drugs [J]. Chin Pharm, 2018, 27(23): 1-4.
- [8] 聂少勇. 水分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.
Nie SY. Water activity measurement and its application in pharmaceutical industry [J]. Chin J Pharm, 2018, 49(12): 1710-1715.
- [9] Nyhan L, Begley M, Mutel A, et al. Predicting the combinatorial effects of water activity, pH and organic acids on *Listeria* growth in media and complex food matrices [J]. Food Microbiol, 2018, (74): 75-85.
- [10] Leggeri MC, Decontardi S, Battilani P. Modelling the sporulation of some fungi associated with cheese, at different temperature and water activity regimes [J]. Int J Food Microbiol, 2018, (278): 52-60.
- [11] Scott WJ. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 °C [J]. Aust J Biol Sci, 1953, 6(4): 549-564.
- [12] Ross T, Ratkowsky DA, Mellefont LA, et al. Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli* [J]. Int J Food Microbiol, 2003, (82): 33-43.
- [13] Marshall BJ, Ohye DF, Christian JHB. Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium [J]. Appl Microbiol, 1971, 21: 363-364.
- [14] 中国药典 2015 年版四部通则 1106 非无菌产品微生物限度检查: 控制菌检查法[Z]. 2015.
ChP 2015 Vol. IV1106 Microbial limit tests of non-sterile products: specified microorganisms [Z]. 2015.
- [15] 陈萍, 陈向东. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
Chen P, Chen XD. Microbiology [M]. Beijing: High Education Press, 2006.
- [16] Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, et al. Brock biology of microbiology [M]. New York: Pearson Education Inc, 2012.
- [17] Miles DW, Ross T, Olley J, et al. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Int J Food Microbiol, 1997, (38): 133-142.
- [18] Stecchini ML, Torre MD, Venir E. Growth of *Listeria monocytogenes* as influenced by viscosity and water activity [J]. Int J Food Microbiol, 2004, (96): 181-187.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



王似锦, 硕士, 副主任药师, 主要研究方向药品微生物检验与控制。
E-mail: wsj@nifdc.org.cn



马仕洪, 硕士, 主任药师, 主要研究方向为药物分析。
E-mail: mash@nifdc.org.cn