doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.08.015

白色念珠菌生长临界水分活度研究*

崔 迎[1,2],夏 天[1,2],任文鑫[1,2],李宏铎[1,2],杨晓莉[2,3△]

(1. 陕西省西安市食品药品检验所,陕西 西安 710054; 2. 国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室,陕西 西安 710065; 3. 陕西省食品药品检验研究院,陕西 西安 710065)

摘要:目的 探讨白色念珠菌生长所需的临界水分活度。**方法** 分别用氯化钠、葡萄糖和甘油制备不同水分活度的沙氏葡萄糖液体培养基,在白色念珠菌菌悬液中分别加入上述培养基,(25 ± 1)℃条件下培养,按2020年版《中国药典(四部)》通则1105倾注平皿法计数,计算菌液浓度,并绘制白色念珠菌生长曲线,通过定性、定量试验确定临界水分活度。**结果** 以氯化钠、葡萄糖及甘油为水分活度调节剂时,白色念珠菌生长临界水分活度,定性试验中分别为0.95,0.88,0.86,定量试验中分别为0.95,0.88,0.87,精确培养基水分活度进一步验证,初步确定白色念珠菌的临界水分活度为0.87。**结论** 该研究可为水分活度在我国非无菌制剂微生物控制的应用和《中国药典》相关内容的增订提供参考。

关键词:水分活度;水分活度调节剂;临界水分活度;白色念珠菌

中图分类号:R921;R94 **文献标志码:A** **文章编号:1006 - 4931(2022)08 - 0065 - 04**

Critical Water Activity for the Growth of *Candida Albicans*

CUI Ying[1,2], XIA Tian[1,2], REN Wenxin[1,2], LI Hongduo[1,2], YANG Xiaoli[2,3]

(1. Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710054; 2. NMPA Key Laboratory of Microbial Detection Technology of Drug, Xi'an, Shaanxi, China 710065; 3. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective To investigate the critical water activity for the growth of *Candida Albicans*. **Methods** *Candida albicans* suspension were cultured in sabouraud dextrose broth of different water activity which made with sodium chloride, glucose and glycerol respectively under the temperature of (25 ± 1)℃. According to the pour plate method in General Rule 1105 of the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume Ⅳ) to calculate the concentration of bacterial solution and draw the growth curve of *Candida albicans*, then the critical water activity was determined by the qualitative and quantitative tests. **Results** The critical water activity of the qualitative and quantitative tests were 0.95, 0.88, 0.86 and 0.95, 0.88, 0.87 respectively, when sodium chloride, glucose and glycerol were used as regulators of water activity. The critical water activity of *Candida albicans* was preliminarily determined to be 0.87 by further verification of precising medium water activity. **Conclusion** This study can provide a reference for the application of water activity in the microbiological control of non - sterile preparation in China and the update of the relevant content in the *Chinese Pharmacopoeia*.

Key words: water activity; water activity regulator; critical water activity; *Candida albicans*

水分活度(a_w)是相同温度下产品水蒸气压(P)与纯水蒸气压(P_0)的比值,能反映产品中水的能量状态,体现水与产品成分之间结合的紧密程度[1]。它不仅关系产品的物理化学稳定性[2],而且是产品中微生物可利用水的量度,可影响微生物的生长繁殖[3-4]。随着a_w的降低,微生物的生长将逐渐受到抑制,当低于某一限值时,微生物将停止生长[5]。第29版《美国药典·国家处方集》(USP29 - NF24 < 1112 >)"水分活度测定在非无菌制剂中的应用"发布[6],为a_w在非无菌制剂微生物控制方面提供了指导[7]。通过控制药品处方中和储存条件下的a_w,减少或消除非无菌制剂中微生物增殖的风险,以及进一步将a_w应用于制药工业,对于制药产品的研发、生产环境的控制、包装材料的选择和药品成品的保存均有重要意义[8-9]。目前,2020年版《中国药典》中收录并检查的代表性微生物生长所需的临界a_w均有报道,如铜绿假单胞菌、大肠埃希菌和沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、黑曲霉的临界a_w分别为0.97,0.95,0.86,0.90,0.92,0.77;念珠菌的临界a_w虽有报道,但白色念珠菌却未找到确切数据[1,7,10-16]。基于此,开展了白色念珠菌临界a_w的相关研究,现报道如下。

1 仪器、试药与菌株

1.1 仪器

Aqualab4TE型水分活度仪(美国Decagon公司);SX - 500型高压蒸汽灭菌锅(日本Tomy公司);1300SERIES A2型生物安全柜(美国Thermo公司);MJ - Ⅱ型

*基金项目:国家药典委员会《中国药典》药品标准提高项目[2018(15)]。

第一作者:崔迎,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药品与食品微生物的检验与分析,(电子信箱)cuiying058@163.com。

△通信作者:杨晓莉,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为药品微生物控制与检验,(电子信箱)yangxiaoli0206@163.com。

霉菌培养箱(上海一恒科技有限公司);SQP型电子天平(德国Sartorius公司,d = 0.01 g)。

1.2 培养基和试剂

沙氏葡萄糖液体培养基(SDB,北京奥博星生物科技有限责任公司,批号为20151028);沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,广东环凯微生物科技有限公司,批号为3304005);试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 菌株

白色念珠菌*Candida albicans*[CMCC(F)98001],为本实验室保存的工作菌株,传代次数为第3代。

2 方法与结果

2.1 线性关系考察

分别使用不同水分活度调节剂(氯化钠、葡萄糖和甘油)调节SDB培养基,制成系列a_w的SDB工作液(25 ℃),以各水分活度调节剂质量(X,g)为横坐标、SDB溶液的a_w(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,$Y_{氯}$ = −0.606 9$X_{氯}$ + 1.002 1(R^2 = 0.998 0),$Y_{葡}$ = −0.001$X_{葡}$ + 0.999 6(R^2 = 0.995 4),$Y_{甘}$ = −0.002 1$X_{甘}$ + 0.997 2(R^2 = 0.993 5)。结果表明,氯化钠、葡萄糖和甘油质量分别在0~25.00 g,0~140.00 g,0~80.00 g范围内与a_w线性关系良好。

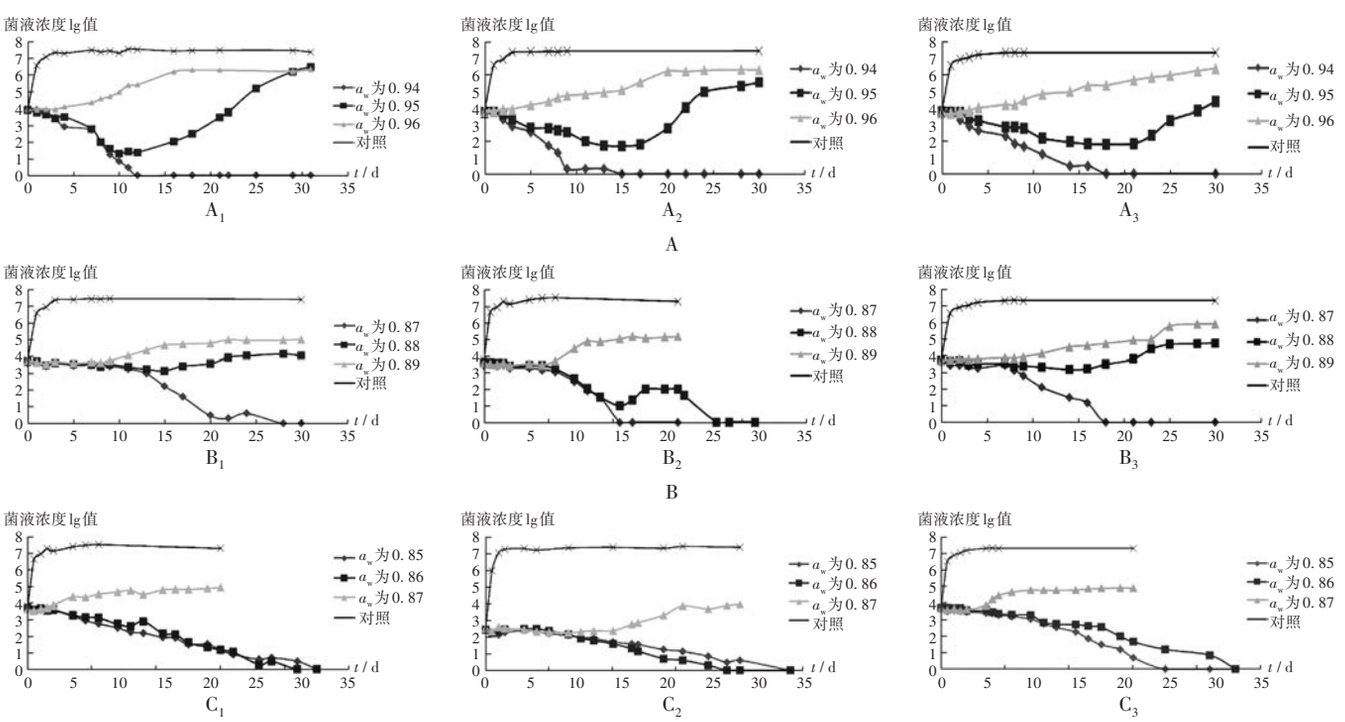
2.2 临界a_w定性研究

根据2.1项所得回归方程配制氯化钠、葡萄糖和甘油为调节剂时不同a_w(0.82~0.99,0.87~0.99,0.83~0.99)的系列SDB溶液Ⅰ。每个a_w平行配制3支,每管10 mL,并接种白色念珠菌新鲜培养物,菌液浓度为10^3 cfu/mL,(25±1)℃条件下培养30 d,再取1 mL培养液转接至10 mL未调节的SDB培养基中,(25±1)℃条件下培养5 d。观察结果,如出现混浊,表明有白色念珠菌生长,即可初步确定白色念珠菌的临界a_w。

结果以氯化钠、葡萄糖、甘油为水分调节剂时,a_w≤0.95,0.88,0.86的SDB溶液培养30 d后3管培养液均澄清,但转接培养5 d后分别有1,3,3管浑浊,故初步确定,氯化钠、葡萄糖、甘油培养介质下白色念珠菌生长的临界a_w分别为0.95,0.88,0.86。

2.3 临界a_w定量验证

分别以氯化钠、葡萄糖、甘油为水分调节剂,配制a_w分别为0.94,0.95,0.96;0.87,0.88,0.89;0.85,0.86,0.87的系列SDB溶液Ⅱ;选取4个a_w点,包括低于临界a_w 0.01单位、临界a_w、高于临界a_w 0.01单位、未调节a_w的SDB培养基(对照)。每个a_w的SDB培养液100 mL,接种白色念珠菌新鲜培养物,菌液浓度为



A_1,B_1,C_1. 第1次试验 A_2,B_2,C_2. 第2次试验 A_3,B_3,C_3第3次试验

A. 氯化钠 B. 葡萄糖 C. 甘油

图1 白色念珠菌生长曲线

A_1,B_1,C_1. The first test A_2,B_2,C_2. The second test A_3,B_3,C_3. The third test

A. Sodium chloride B. Glucose C. Glycerol

Fig. 1 Growth curve of *Candida albicans*

10^3 cfu / mL，(25 ± 1)℃条件下培养 30 d，每 1 ~ 2 天按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 1105 倾注平皿法计数，计算培养液菌浓度[16]。以时间为横坐标、菌液浓度的对数(lg)值为纵坐标绘制白色念珠菌生长曲线。结果见图 1。

可见，在高 a_w(> 0. 99)的培养基中白色念珠菌生长较迅速，随着 a_w降低至接近定性试验的临界值，其生长曲线明显趋缓；当 a_w低于该临界值时，生长曲线呈单调递减趋势，表明此时白色念珠菌无法生长。

以氯化钠为培养介质，当 SDB 培养液 a_w = 0. 96 时，白色念珠菌的生长十分缓慢，已无明显对数生长期；当 a_w = 0. 95 时，白色念珠菌先衰减，再生长；当 a_w = 0. 94 时，白色念珠菌数量逐步递减直至完全死亡。定量与定性试验结果一致，故此条件下临界 a_w为 0. 95。

以葡萄糖为培养介质，当 SDB 培养液 a_w = 0. 89 时，3 次试验结果基本一致，白色念珠菌的生长曲线缓慢上升。当 a_w = 0. 88 时，第 1 次和第 3 次试验，白色念珠菌的生长曲线缓慢上升；第 2 次试验，其生长曲线先下降，后缓慢上升，再保持短暂的相对稳定，30 d 之后又开始下降，直至全部死亡，在这个过程中，白色念珠菌菌数始终未达到初始菌数并最终降至 0，可认定为未生长。当 a_w = 0. 87 时，白色念珠菌均缓慢死亡。定量与定性试验结果一致，故此条件下临界 a_w为 0. 88。

以甘油为培养介质，当 SDB 培养液 a_w = 0. 87 时，白色念珠菌缓慢生长，30 d 时 3 次试验结果均表明培养液中的白色念珠菌有增长；当 a_w = 0. 86 和 0. 85 时，白色念珠菌菌数逐渐降低，30 d 时培养液中均有菌存活，但在 40 ~ 50 d 时，菌数均逐步降至 0。定量、定性试验中临界水分活度不一致，原因为定性试验中 30 d 时，为方便观察将培养物转接至未进行 a_w调节的 SDB 培养基中，培养条件的改变给了 a_w = 0. 86 时 SDB 培养液中原未完全死亡的白色念珠菌重新生长的机会，而非白色念珠菌在 a_w = 0. 86 的 SDB 培养液中能生长。故此条件下临界 a_w应确定为 0. 87。

综上，选择 3 种介质下 a_w最低值(0. 87)为白色念珠菌临界 a_w。

3 讨论

白色念珠菌的生长受水分活度调节剂种类的影响。在相同的 a_w条件下对白色念珠菌生长的抑制作用，氯化钠较强，而葡萄糖和甘油较弱。这可能与氯化钠对微生物具有抑制作用[17]，而其余二者可作为碳源参与微生物生长代谢有关[18]。

在临界 a_w的定量试验中，以葡萄糖作为水分活度调节剂 a_w = 0. 88 的 3 次试验中有 1 次白色念珠菌无法生长，进一步检测表明，这 3 次试验中，白色念珠菌在 a_w为 0. 882 7 和 0. 882 1 时能生长，a_w为 0. 879 2 时则不能，说明白色念珠菌在 0. 88 的 a_w附近十分敏感，也表明研究确定的白色念珠菌临界 a_w有较高的可信度。

本研究结果显示，随着 a_w的降低，白色念珠菌生长繁殖受到的抑制作用逐渐增强，这符合 a_w对微生物生长影响的一般规律。通过控制 a_w，可降低药品中微生物增殖的风险，有助于提高非无菌制剂质量控制的水平，以及减少相关检验成本的消耗(单独的 a_w测量不能作为减少微生物限度检查的理由)。然而，作为一种广泛存在于自然界和人体的常见条件致病菌，白色念珠菌早在 2005 年版《中国药典》中便被列为计数方法适用性试验用菌，2010 年版《中国药典》起又增设为控制菌检查菌，但至今仍无文献与研究确认其临界 a_w。本研究中提供了该部分的试验及结果，期望有助于未来《中国药典》“水分活度测定在非无菌制剂微生物控制中的应用”等相关内容的增订。

参考文献

[1] 鲍方名，沈海英. 水分活度与非无菌药品微生物控制[J]. 中国药事，2018，32(7)：913 - 918.
[2] ROCKLAND LB，NISHI SK. Influence of water activity on food product quality and stability[J]. Food Technology，1980，34：42 - 51.
[3] 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(23)：1 - 4.
[4] SCOTT WJ. Water relations of food spoilage microorganisms[M]. 7th ed. New York：Elsevier Inc.，1957：83 - 127.
[5] 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(5)：2946 - 2951.
[6] The United States Pharmacopeial Convention. USP 29 - NF 24 (Second Suppplement)[M]. Rockville：The United States Pharmacopeial Convention，2006：3802 - 3803.
[7] 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.
[8] 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.
[9] 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.
[10] 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.
[11] The United States Pharmacopeial Convention. UPS 40 - NF 35[M]. Rockville：The United States Pharmacopeial Convention，2017：1416 - 1418.
[12] 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]. Pharmacopeial Forum，1999，25(6)：8974.