doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2022.07.019

产气荚膜梭菌生长所需最低水分活度研究*

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

（1. 陕西省西安市食品药品检验所·国家药品监督管理局重点实验室，陕西 西安　710054；2. 陕西省食品药品监督检验研究院，陕西 西安　710065）

摘要：目的　考察产气荚膜梭菌在不同水分活度下的生长趋势，以及生长所需最低水分活度。**方法**　分别以氯化钠、葡萄糖和甘油调节硫乙醇酸盐流体培养基（FTM），至水分活度限值、低于水分活度限值0.01、高于水分活度限值0.01。取产气荚膜梭菌菌悬液适量，加入上述培养基中，绘制3种介质调节的水分活度条件下产气荚膜梭菌的生长曲线。**结果**　水分活度相同时，3种介质用量差异较大；当水分活度为0.98时，每100 mL FTM中分别需要添加氯化钠3.51 g、葡萄糖13.80 g、甘油9.08 g；在3种水分活度调节剂的作用下，产气荚膜梭菌生长所需最低水分活度分别为0.98，0.98，0.95。**结论**　水分活度会影响产气荚膜梭菌的生长与迟缓期的时间，且随着氯化钠、葡萄糖和甘油质量的增加，水分活度呈下降趋势。

关键词：水分活度；水分活度调节剂；产气荚膜梭菌；非无菌药品；微生物控制

中图分类号：R917　　**文献标志码：A**　　**文章编号：1006－4931（2022）07－0078－04**

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

XIA Tian[1], *CUI Ying*[1], *REN Wenxin*[1], *YANG Xiaoli*[2], *WU Kunjie*[1], *LI Hongduo*[1]

(1. Xi'an Institute for Food and Drug Control·Key Laboratory of National Medical Products Administration, Xi'an, Shaanxi, China 710054; 2. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective　To investigate the growth trend of *Clostridium perfringens* under different water activities and the minimum water activity required for growth. **Methods**　The water activity of fluid thioglycollate medium (FTM) was adjusted with NaCl, glucose and glycerol to the water activity limit, lower than the water activity limit 0.01 and higher than the water activity limit

*基金项目：国家药典委员会《中国药典》药品标准提高项目[15]。

第一作者：夏天，女，硕士，主管药师，研究方向为药品微生物检验与分析，（电子信箱）253196144@qq.com。

△通信作者：李宏铎，男，硕士，主管药师，研究方向为食品、药品微生物分子检验，（电子信箱）446560354@qq.com。

的质量。由表4可知，3批样中盐酸小檗碱、栀子苷及丹皮酚的平均含量分别为1.180 7，0.675 6，0.823 2 mg/mL，将其平均值的70%作为含量测定下限值，初步拟订黄栀祛伤水中盐酸小檗碱、栀子苷及丹皮酚的含量限度分别为0.83，0.47，0.58 mg/mL。

3.4　方法评价

本研究中建立的方法操作简便，结果准确，灵敏度高，重复性好，拟订的质量标准为控制黄栀祛伤水的质量提供了参考。

参考文献

[1] 唐　爽，李修洋，邸　莎. 黄柏的临床应用及其用量探究[J]. 吉林中医药，2019，39(8)：1008－1012.

[2] 胡献国. 清热燥湿说三黄[J]. 医师在线，2019，9(26)：37－38.

[3] 辛　辉. 活血化瘀法治疗软组织损伤疗效观察[J]. 北方药学，2019，16(4)：106－107.

[4] 翟春梅，孟祥瑛，付敬菊，等. 牡丹皮的现代药学研究进展[J]. 中医药信息，2020，37(1)：109－114.

[5] 聂黎行，孙　磊，戴　忠，等. 活血止痛胶囊中乳香来源鉴别方法研究[J]. 中国医药导报，2019，16(9)：114－116.

[6] 徐佳馨，王继锋，颜娓娓，等. 薄荷的药理作用及临床应用[J]. 食品与药品，2019，21(1)：81－84.

[7] 端木玮晨，匡海学，王秋红. 白矾的本草考证[J]. 广东药学院学报，2019，35(3)：466－469.

[8] 雷　艳，詹雪艳，李　飞，等. 黄连薄层鉴别研究[J]. 中南药学，2020，18(2)：238－242.

[9] 刘洪超，王　欢，林　林，等. 乙肝解毒胶囊的定性定量方法研究[J]. 中国药品标准，2020，21(3)：206－212.

[10] 温　馨，江耀伦，陈素珍，等. 大七厘散中大黄及当归薄层色谱鉴别方法改进[J]. 中国药业，2017，26(14)：7－9.

[11] 薛　冬，蒋永梅，汤加兵，等. UPLC法测定脏连丸中6个生物碱和4个黄酮成分的含量[J]. 中国药师，2020，23(8)：1651－1655.

[12] 林　林，刘广桢，于凤蕊，等. 高效液相色谱法同时测定乙肝解毒胶囊中12种成分的含量[J]. 中国药学杂志，2020，55(7)：557－561.

[13] 缪　红，徐丹洋，苏　健. 大黄泻火散质量标准改进研究[J]. 中国药业，2018，27(23)：19－23.

[14] 李　沁，杨　臣，游勇基. HPLC－DAD法同时测定小儿退热合剂中绿原酸，栀子苷，黄芩苷和丹皮酚的含量[J]. 药物分析杂志，2017，37(1)：153－160.

[15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（一部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：318－319.

（收稿日期：2021－06－28；修回日期：2021－11－18）

0.01. An appropriate amount of *Clostridium perfringens* suspension was taken and added to the above medium to draw the growth curves of *Clostridium perfringens* under the conditions of water activity regulated by the three media. **Results** When the water activity was the same, the amount of the three media varied greatly. When the water activity was 0.98, every 100 mL FTM needed to add 3.51 g NaCl, 13.80 g glucose and 9.08 g glycerol. Under the action of the three water activity regulators, the minimum water activities required for the growth of *Clostridium perfringens* were 0.98, 0.98 and 0.95. **Conclusion** Water activity can affect the growth curve and the time of retardation of *Clostridium perfringens*, and with the increase of the mass of NaCl, glucose and glycerol, the water activity showed a downward trend.

Key words: water activity; water activity regulator; *Clostridium perfringens*; nonsterile drug; microbial control

水分活度由澳大利亚科学家Scott于1953年提出，是指产品水蒸气压与同温度下纯水蒸气压的比值[1-2]。其在本质上可理解为结合水含量越高，水分活度越低[2]，可用于微生物生长繁殖的水越少[3-4]。作为微生物可利用水量度的重要参数，水分活度也是影响微生物生长的关键因素[5]，在食品和化妆品的微生物控制方面已有应用[6-7]。2006年，《美国药典》1112章节中已发布水分活度测定在非无菌制剂中的应用指导原则[8]。本研究中参考该指导原则中产气荚膜梭菌生长所需的最低水分活度（0.95）及文献[9-12]，分别以氯化钠、葡萄糖和甘油作为水分活度调节剂，调节培养基的水分活度值在0.90～0.99范围内[2,13]，测定产气荚膜梭菌生长所需的最低水分活度，以为《中国药典》相关内容的增订提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与菌种

仪器：Aqualab 4TE型水分活度仪（美国Meter Group Inc.）；THERMO1378型生物安全柜（赛默飞世尔科技有限公司）；LRH-250型生化培养箱（上海一恒科技有限公司）；SX-500型高压蒸汽灭菌器（日本Tomy公司）；SQP型电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司，精度为10 mg）。

试剂：硫乙醇酸盐流体培养基（FTM，北京三药科技开发公司，批号为170808）；胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基（TSC，北京路桥技术有限责任公司，批号为171108；氯化钠（批号为20180509），丙三醇（批号为20180223），均购自国药集团化学试剂有限公司；葡萄糖（天津市科密欧化学试剂有限公司，批号为20180110）。

菌种：产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*，广东环凯生物科技有限公司，编号为ATCC 13124，工作用菌株为第3代）。

1.2 方法

不同水分活度培养基的配制：分别以氯化钠、葡萄糖及甘油作为水分活度调节剂，并测定其灭菌后的水分活度值，制备不同水分活度的FTM。以3种水分活度调节剂的质量对培养基水分活度值绘制标准曲线。

产气荚膜梭菌菌液的制备：将产气荚膜梭菌转接至FTM中，（36±1）℃厌氧培养24 h，用无菌生理盐水稀释，制备成不同浓度的菌悬液。

定性试验：按标准曲线，配制水分活度在0.90～0.99范围内梯度为0.01的系列FTM；同时配制不调节水分活度的FTM，作为对照组（T_0）。取产气荚膜梭菌菌悬液，分别加入上述FTM中，每管装量20 mL，使菌液浓度达到10^2 cfu/mL。各组培养物置（36±1）℃温度条件下厌氧培养30 d，逐日观察生长情况，目测判断，浑浊表明有生长，澄清表明未生长。

定量试验：通过定性试验，初步获得产气荚膜梭菌在不同介质的FTM中生长所需最低水分活度，选择最低水分活度附近3个水平，即低于水分活度限值0.01（T_1）、水分活度限值（T_2）和高于水分活度限值0.01（T_3），同时配制不调节水分活度的FTM，装量均为100 mL，接种产气荚膜梭菌菌悬液，使菌液浓度达到10^2 cfu/mL。于（36±1）℃温度条件下培养，分别于0，2，16，18，20，24，42，48，72，90，120，144 h时以TSC培养计数。以测得平均菌落数的对数值（logcfu）对时间（t，h）作图，绘制生长曲线，重复3次。

2 结果

2.1 不同介质调节FTM水分活度的标准曲线绘制

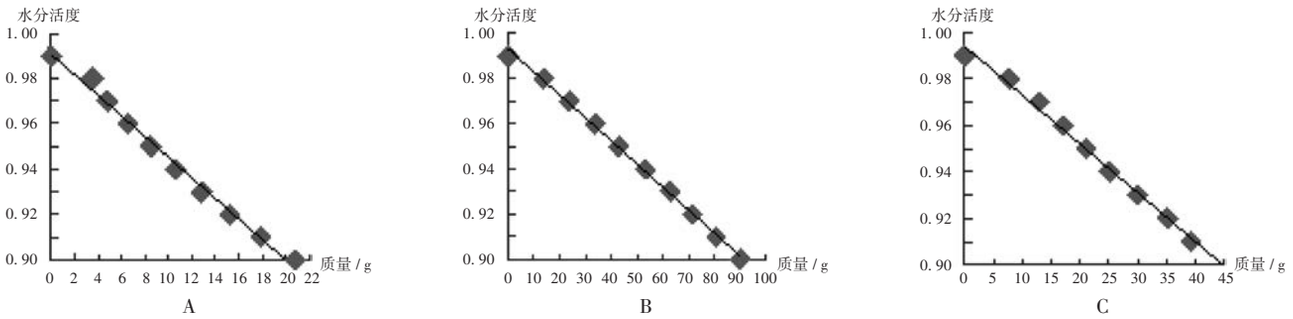
由图1可知，随着氯化钠、葡萄糖和甘油质量的增加，水分活度呈下降趋势。相同水分活度时，3种水分活度调节剂质量差异较大。当水分活度为0.98时，每100 mL FTM中分别需要添加氯化钠3.51 g、葡萄糖13.80 g、甘油9.08 g。

2.2 定性试验结果

以氯化钠、葡萄糖和甘油为水分活度调节剂的FTM中，产气荚膜梭菌的最低生长水分活度分别为0.98，0.98，0.95。这与《美国药典》中产气荚膜梭菌生长所需最低水分活度（0.95）[8]一致。

2.3 定量试验结果

产气荚膜梭菌在3种不同水分活度调节剂中的生长曲线见图2。从生长曲线来看，以氯化钠和葡萄糖调节FTM水分活度时，产气荚膜梭菌生长所需最低水分活度均为0.98；以甘油作调节剂时为0.95，与定性试验

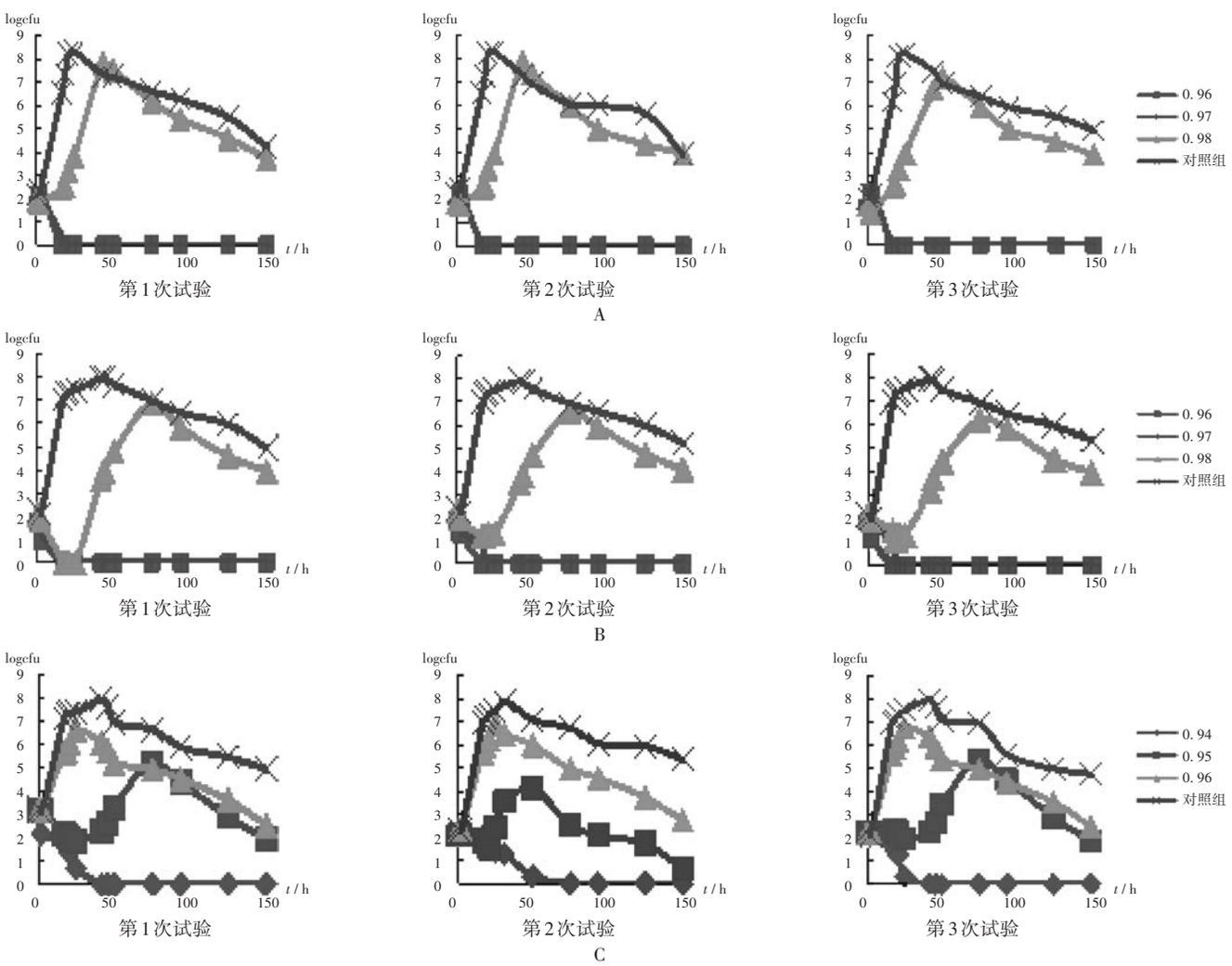


A. 氯化钠 B. 葡萄糖 C. 甘油

图 1 FTM 中 3 种水分活度调节剂质量 – 水分活度标准曲线

A. NaCl B. Glucose C. Glycerol

Fig. 1 Standard curves of quality – water activity of three water activity regulators in FTM



A. 氯化钠 B. 葡萄糖 C. 甘油

图 2 不同介质 FTM 中产气荚膜梭菌的生长曲线

A. NaCl B. Glucose C. Glycerol

Fig. 2 Growth curves of *Clostridium perfringens* in FTM with different media

结果一致。根据定性试验结果，以氯化钠和葡萄糖调节水分活度时，T_1，T_2，T_3应分别为 0. 97，0. 98，0. 99，但 T_3 与对照组水分活度相同。为保证试验完整性，并探讨产气荚膜梭菌在水分活度限值以下的生长情况，本研究中将氯化钠和葡萄糖介质中 T_1，T_2，T_3 调整为 0. 96，0. 97，0. 98。

由图 2 可知，水分活度会影响产气荚膜梭菌的生长。产气荚膜梭菌在水分活度较高时生长较旺盛，在水

分活度较低时生长缓慢，低于一定值时则停止生长甚至死亡。由图 2 A 和图 2 B 可知，产气荚膜梭菌在水分活度大于 0.98 时生长较快，低于 0.98 时不生长，且 3 次试验结果一致，重复性良好，表明以氯化钠和葡萄糖调节水分活度，产气荚膜梭菌最低生长水分活度为 0.98。由图 2 C 可知，当水分活度为 0.96 时，生长较快，生长趋势与对照组相似；当水分活度为 0.95 时，虽有生长现象，但其生长趋势明显弱于 0.96，表明以甘油调节水分活度，产气荚膜梭菌最低生长水分活度为 0.95。

由图 2 可知，水分活度与产气荚膜梭菌的菌液浓度呈正相关，产气荚膜梭菌的菌落数随水分活度的降低而减少。同时，水分活度为 0.98 时，氯化钠的菌液浓度对数值略低于对照组，葡萄糖的低于氯化钠；甘油在水分活度为 0.95 时的菌液浓度对数值显著低于对照组，第 2 次试验中表现尤为明显。不同介质调节水分活度会影响产气荚膜梭菌生长迟缓期的长短。由图 2 A 可知，水分活度为 0.98 时，产气荚膜梭菌的迟缓期为 0 ~ 20 h。由图 2 B 可知，水分活度为 0.98 时，产气荚膜梭菌的迟缓期为 0 ~ 40 h，且其生长先短暂停滞，随着时间的延长生长繁殖逐渐恢复。由图 2 C 可知，当水分活度高于 0.95 时，产气荚膜梭菌生长较快，16 h 即开始对数生长期；当水分活度为 0.95 时，产气荚膜梭菌 44 h 后开始进入对数期，迟缓期时间相对较长。表明产气荚膜梭菌出现临界生长状态，与产气荚膜梭菌生长所需最低水分活度（0.95）的结果一致。

3 讨论

在厌氧培养条件下，以氯化钠和葡萄糖为水分活度调节剂，当水分活度低于 0.98 时，产气荚膜梭菌停止生长；以甘油为水分活度调节剂，当水分活度低于 0.95 时，产气荚膜梭菌停止生长。其中，产气荚膜梭菌对甘油最耐受。相同菌液接种量下，甘油的 0 h 菌落数对数值高于葡萄糖，氯化钠最低。这可能是因为产气荚膜梭菌是一种革兰阳性厌氧菌[14]，甘油可作为厌氧菌的一种保存助剂[15]，可在一定程度上促进其生长。

大多数微生物的代谢活动需要水分子参与，水分活度降低会导致微生物的代谢活性降低[16]。本研究结果表明，随着水分活度的降低，产气荚膜梭菌的生长活性逐渐受到抑制。由生长曲线可知，产气荚膜梭菌菌液浓度的降低，停滞时间的延长，都与水分活度降低呈正相关。水分活度与微生物的生长密切相关，是判断微生物风险与控制产品质量稳定性的重要指标，但目前微生物污染控制方面的应用和研究仍属罕见[17-18]。故有必要深入研究水分活度在非无菌药品微生物检验中的应用，以缩短药品放行周期，降低库存成本和检测成本。

参考文献

[1] SCOTT WJ. Water relations of staphylococcus aureus at 30 ℃[J]. Aust J Biol Sci, 1953, 6(4): 549 - 564.
[2] 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.
[3] CUNDELL AM, FONTANA AJ. Water activity applications in the pharmaceutical industry [M]. Richmond: Davis Healthcare International Publishing, 2009: 151.
[4] ANTHONY JF. Measuring water activity as a means to reduce microbial limit testing[J]. Tables & Capsules, 2008, 10: 28 - 33.
[5] 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.
[6] 黄晓燕，刘铖珺，李长城，等. 低水分活度食品微生物控制技术研究现状[J]. 食品与发酵工业，2020, 46(23): 286 - 292.
[7] 张 静，谢 茵，吴良发，等. 水分活度在化妆品微生物控制方面的应用分析[J]. 中国医药科学，2019, 9(16): 59 - 61.
[8] The United States Pharmacopieial Convention. USP 29 - NF 24[M]. Rockville: The United States Pharmacopieial Convention, 2006: 3802.
[9] 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.
[10] DHALIWAL HK, GÄNZLE M, ROOPESH MS. Influence of drying conditions, food composition, and water activity on the thermal resistance of Salmonella enterica [J]. Food Research International, 2021, 147: 110548.
[11] NYHAN L, BEGLEY M, MUTEL A, et al. Callanan. Predicting the combinatorial effects of water activity, pH and organic acids on Listeria growth in media and complex food matrices [J]. Food Microbiology, 2018, 74: 75 - 85.
[12] LEGGIERI 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.
[13] 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.
[14] 张 辉，包红朵. 产气荚膜梭菌耐药及防控研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2020, 11(6): 1846 - 1851.
[15] 黄家乐，王 玥，何 睿，等. 制药企业微生物实验室菌种保存方法的探讨[J]. 中国药事，2017, 31(9): 1007 - 1011.
[16] 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.
[17] 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.
[18] 闵 红，杨 静，呼延婷婷，等. 片剂水分活度迁移规律与载荷微生物生长状况研究[J]. 中国药业，2019, 28(22): 21 - 25.

（收稿日期：2021 - 09 - 18；修回日期：2021 - 11 - 08）