

# 金黄色葡萄球菌与烟曲霉生长最低水分活度的研究

孙晗, 钱凌, 陈君豪, 沈泓, 陶巧凤\* (浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

**摘要:** 目的 探讨使用葡萄糖、甘油、氯化钠 3 种介质调节不同水分活度的生长环境对金黄色葡萄球菌及烟曲霉生长的影响。方法 分别加入 3 种不同的介质控制胰酪大豆胨液体(TSB)培养基、沙氏葡萄糖琼脂(SDA)培养基的水分活度, 通过定时对金黄色葡萄球菌进行平板计数、烟曲霉的菌落生长直径测量, 判定微生物生长的最低水分活度。结果 金黄色葡萄球菌在甘油与氯化钠调节的水分活度环境下, 菌落数均呈下降趋势; 在蔗糖介质调节水分活度为 0.85, 0.86 时, 菌落数在初始值上下波动, 基本维持不变; 调节水分活度为 0.87 时, 菌落数在略减后迅速增加。烟曲霉在 3 种介质调节的所有水分活度环境下, 均处于生长停滞状态。结论 环境水分活度的高低对金黄色葡萄球菌、烟曲霉的生长有一定影响。金黄色葡萄球菌在蔗糖介质中的生长最低水分活度近似为 0.86, 烟曲霉生长最低水分活度 $>0.83$ 。金黄色葡萄球菌在甘油与氯化钠基质, 烟曲霉在 3 种基质中的最低水分活度与美国药典中收录的最低水分活度值并不相符。

**关键词:** 水分活度; 金黄色葡萄球菌; 烟曲霉; 微生物控制

中图分类号: R927.12 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)03-0380-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.03.016

引用本文: 孙晗, 钱凌, 陈君豪, 等. 金黄色葡萄球菌与烟曲霉生长最低水分活度的研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(3): 380-384.

## Study on the Minimum Water Activity Required for Growth of *Staphylococcus Aureus* and *Aspergillus Fumigatus*

SUN Han, QIAN Ling, CHEN Junhao, SHEN Hong, TAO Qiaofeng\* (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the effects on *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus fumigatus* growth of different water activities by adding glucose glycerol and sodium chloride. **METHODS** Three different media were added to control the water activity of TSB medium and SDA medium respectively. The minimum water activity for microbial growth was judged by counting *Staphylococcus aureus* and measuring the colony growth diameter of *Aspergillus fumigatus* in successive time. **RESULTS** The colony number of *Staphylococcus aureus* decreased under the water activity regulated by glycerol and sodium chloride. When the water activity was adjusted at 0.85 and 0.86 in sucrose medium, the colony number fluctuated up and down at the initial value, and basically remained unchanged. When the water activity was adjusted at 0.87, the colony number increased rapidly after a slight decrease. The growth of *Aspergillus fumigatus* was stagnant under all water activities regulated by three media. **CONCLUSION** The level of environmental water activity has a certain impact on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus fumigatus*. The minimum water activity required for the growth of *Staphylococcus aureus* in sucrose medium is approximately 0.86 and the minimum water activity required for the growth of *Aspergillus fumigatus* is greater than 0.83. The minimum water activity of *Staphylococcus aureus* in glycerol and sodium chloride substrates, and *Aspergillus fumigatus* in the three substrates do not match the minimum water activity values recorded in the US Pharmacopoeia.

**KEYWORDS:** water activity; *Staphylococcus aureus*; *Aspergillus fumigatus*; microbial control

水分活度是非无菌制剂进行微生物控制的重要参数。区别于水分含量的概念, 水分活度反映的是水的能量状态, 表示水与产品成分之间结合的紧密程度。水分活度是相同温度下产品水蒸汽压( $P$ )与纯水蒸汽压( $P_0$ )的比值, 在数值上等于封闭系统中产品产生相对湿度的 1%。相对湿度可通过直接测量蒸汽压或采用露点法获得<sup>[1-2]</sup>。

水分活度的研究与应用在食品行业中非常广泛, 对于食品中常见的腐败菌、致病菌生长所需最低水分活度有一定的研究基础<sup>[3-7]</sup>。Chordash 等<sup>[8]</sup>发现当水分活度分别 $<0.98$ ,  $0.98$  和  $0.96$  时, 蛋挞、豌豆和牛肉制品中细菌生长受到抑制。当水分活度分别 $<0.94$  和  $0.96$  时, 蛋挞和火腿制品中的细菌不能生长。Ingham 等<sup>[9]</sup>通过研究发现, 真空包装的

作者简介: 孙晗, 男, 硕士, 工程师 E-mail: sunhan435@qq.com

\*通信作者: 陶巧凤, 女, 主任药师 E-mail: taoqiaofeng@126.com

牛肉干水分活度 $\leq 0.87$ 时,能有效抑制金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特菌的生长。美国药典于2006年在<1112>中收录了水分活度测定在非无菌制剂的应用,用以指导水分活度在非无菌制剂微生物控制中的应用<sup>[10]</sup>。虽然其中一些微生物生长所需的最低水分活度值需要进行进一步研究验证,但是在药品中引入水分活度的概念有助于优化药品处方,对于药品微生物污染源头控制具有重要意义。同时通过微生物风险评估,将水分活度应用于微生物控制策略,不仅能节约成本,提升效率,而且有助于提升产品质量。

金黄色葡萄球菌是一种需氧或兼性厌氧革兰氏阳性球状细菌,在培养基中菌落特征表现为圆形,菌落表面光滑,颜色为无色或者金黄色,隶属于葡萄球菌属;广泛存在于空气、水、灰尘及人和动物的排泄物中。它是一种人兽共患病原菌,可导致人和动物的多种疾病,包括伪膜性肠炎、败血症和脓毒症等,严重威胁人类和动物的生命安全<sup>[11]</sup>。烟曲霉是一种真菌,广泛分布于土壤、发霉谷物、有机坏死物、饲料等。烟曲霉的孢子可以在空气中传播,患者通过吸入寄生在环境中的曲霉孢子而感染<sup>[12]</sup>。

本研究中使用氯化钠、甘油、蔗糖3种不同介质调节胰酪大豆胨液体培养基(TSB)和沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)的水分活度,降低金黄色葡萄球菌和烟曲霉可利用的“游离水”,从而使微生物生长停滞、不能繁殖,探讨金黄色葡萄球菌及黑曲霉所需的最低水分活度,旨在完善非无菌制剂微生物的应用性控制策略,为中国药典制定相应指导原则提供研究基础,强化药品微生物污染的源头控制和过程控制。

## 1 仪器、菌种与试剂

### 1.1 仪器

Aqualab Series 4TE DUO型水分活度仪(美国Decagon公司);生物安全柜(HealForce中国力康);梅特勒-托利多ME2002电子天平、IF450恒温细菌培养箱、ICP450低温霉菌培养箱均购自德国Memmer公司。

### 1.2 菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003,中国医学细菌保藏中心];烟曲霉(CICC 40537,中国工业微生物菌种保藏管理中心)。

### 1.3 试剂

胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)(批号:1068135)、TSB(批号:1065575)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)(批号:1069035)均购自广东环凯生物科技有限公司;甘油(批号:20180921)、氯化钠(批号:20160111)、蔗糖(批号:20160105)均购自上海沪试实验室器材股份有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 金黄色葡萄球菌生长所需最低水分活度研究方法

**2.1.1 培养基制备** 分别使用甘油、氯化钠、蔗糖调节TSB培养基,使灭菌后的培养基水分活度分别为0.85, 0.86和0.87,同时配制不调节水分活度的TSB培养基,灭菌。以上4种培养基分别以 $T_L$ 、 $T$ 、 $T_H$ 和 $T_0$ 表示。上述调节水分活度的培养基各配制2份,其中1份再次测量水分活度值,以确定其灭菌前后水分活度无变化,备用。

**2.1.2 菌液制备** 按中国药典2020年版要求。金黄色葡萄球菌制备成 $10^4$  cfu·mL<sup>-1</sup>的菌悬液。

**2.1.3 接种** 取制备好的菌悬液各1 mL分别接种至上述制备好的TSB培养基100 mL中,混匀。 $T_L$ 、 $T$ 、 $T_H$ 为试验组, $T_0$ 为对照组。

**2.1.4 培养** 将 $T_L$ 、 $T$ 、 $T_H$ 和 $T_0$ 置35℃培养,于0, 2, 4, 6, 24, 36, 48, 72, 96, 120 h,分别取1 mL接种平皿,倾注TSA培养基,于35℃培养48 h。每个时间点每组平行测定3皿,计数。

**2.1.5 绘图** 以测得的菌落数(cfu)的常用对数值,对时间(h)作图,绘制生长速率曲线。

### 2.2 烟曲霉菌生长所需最低水分活度研究方法

**2.2.1 培养基制备** 分别使用甘油、氯化钠、蔗糖调节SDA培养基,使灭菌后的培养基水分活度分别为0.81, 0.82和0.83,同时配制不调节水分活度的SDA培养基,灭菌。以上4种培养基分别以 $T_L'$ 、 $T'$ 、 $T_H'$ 和 $T_0'$ 表示。上述调节水分活度的培养基各配制2份,其中1份再次测量水分活度值,以确定其灭菌前后水分活度无变化,备用。

**2.2.2 菌液制备** 按中国药典2020年版要求,烟曲霉制备成 $10^4$  cfu·mL<sup>-1</sup>的孢子悬液。

**2.2.3 预培养** 无菌操作将滤膜(同微生物限度检查要求)正面朝上贴于未调节水分活度灭菌后的SDA培养基上。将制备好的菌液用接种针点植于滤膜中心位置,25℃预培养48 h。

**2.2.4 观察及转移** 待菌落生长至直径为5~10 mm时,分别测量滤膜垂直的2个直径,取平均值(2次测量差值 $\leq 2$  mm)记为初始大小。在生物安全柜内将菌落连同滤膜转移至制备好的不同梯度水分活度的SDA平皿上。 $T_L'$ 、 $T'$ 、 $T_H'$ 为试验组, $T_0'$ 为对照组。设置3次平行试验。

**2.2.5 培养** 将平皿置于含有对应水分活度盐溶液的干燥器中,置于25℃下培养。于0,1,3,6,8,12,21,32 d时间点,分别测量菌落大小,测量2次取其平均值。

**2.2.6 绘图** 以菌落直径大小(mm)对时间(d)作图,绘制生长速率曲线。

### 2.3 结果

未添加调节介质的TSB的水分活度约0.99,SDA的水分活度约0.98。

**2.3.1 金黄色葡萄球菌生长所需最低水分活度研究** 金黄色葡萄球菌在无介质添加的TSB培养基中的生长曲线较为典型,初始进入快速增长期,在48 h达到稳定期,细菌数基本保持稳定。使用甘油介质进行水分活度调节的 $T_L$ 组、 $T$ 组、 $T_H$ 组中,金黄色葡萄球菌生长呈现出一致的情况,细菌数迅速减少,在72 h左右细菌数基本趋于0,

说明金黄色葡萄球菌在甘油介质调节的0.85,0.86,0.87水分活度下均无法存活。使用氯化钠介质与蔗糖介质调节水分活度的 $T$ 组、 $T_L$ 组与上述甘油组一致,金黄色葡萄球菌数在50 h左右几乎全部死亡。与甘油介质组中不同的是,氯化钠与蔗糖介质调节的 $T_H$ 组中,金黄色葡萄球菌在初期呈现相同的细菌数骤减,但在40 h左右均又出现细菌繁殖,细菌数量增长后又再次降低。说明这2种介质在0.87的水分活度下,金黄色葡萄球菌生长受到一定抑制,但依然能维持较短时间的生长繁殖状态。结果见图1。

**2.3.2 烟曲霉生长所需最低水分活度研究** 烟曲霉在没有调节水分活度的SDA培养基中,菌落不断生长,菌落直径持续增大,在7~8 d测量时间点时已长满整个平皿。经过介质调节的所有水分活度组别,烟曲霉菌落直径基本维持初始时的大小,没有明显的生长迹象。因此推测烟曲霉在3种介质调节的水分活度环境中生长的最低水分活度 $>0.83$ 。结果见图2。

### 3 讨论

在本次实验中,在使用氯化钠、甘油和蔗糖介质调节的水分活度为0.85,0.86的生长环境中,金

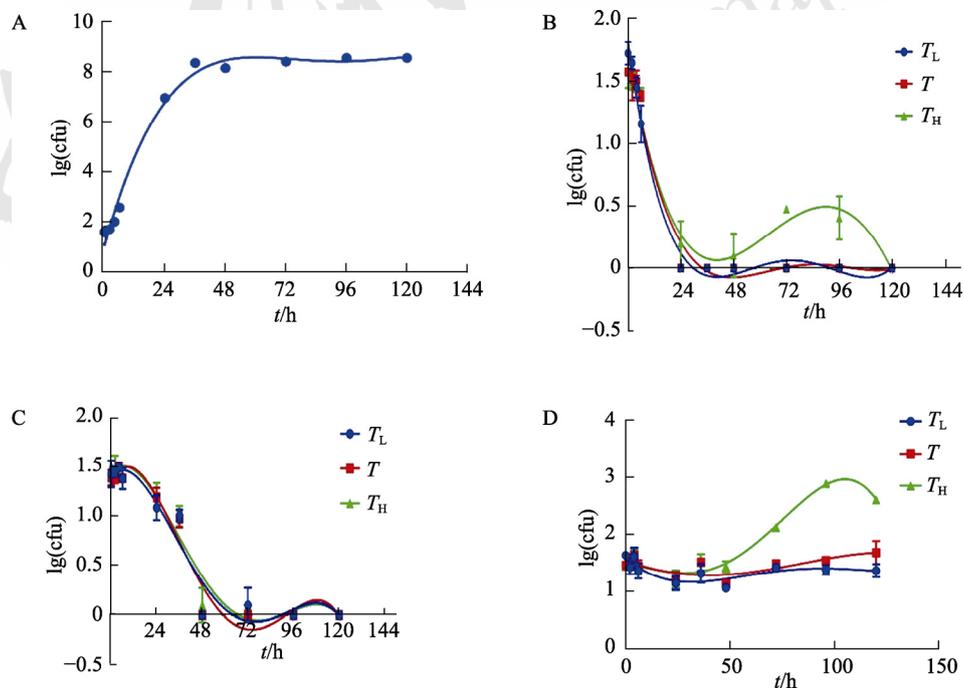


图1 3种水分活度在不同培养基下金黄色葡萄球菌生长情况  
A-无介质培养基; B-氯化钠; C-甘油; D-蔗糖。

Fig. 1 Growth of *Staphylococcus aureus* under three kinds of water activity in different culture medium  
A-medium-free medium; B-sodium chloride; C-glycerin; D-sucrose.

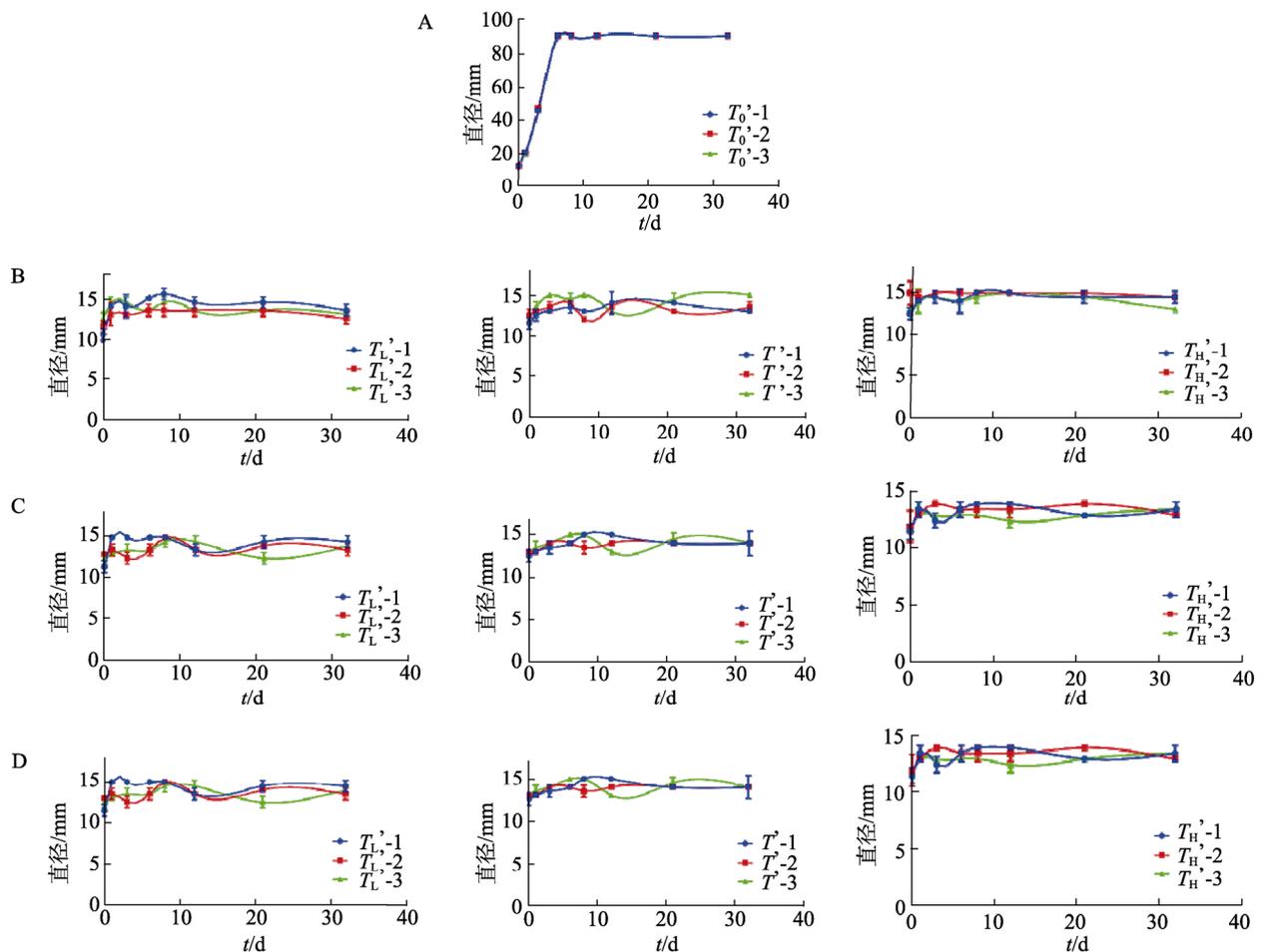


图2 3种水分活度在不同培养介质下烟曲霉生长情况  
A-无介质培养基; B-氯化钠; C-甘油; D-蔗糖。

Fig. 2 Growth of *Aspergillus fumigatus* under three water activities in different culture media  
A-medium-free medium; B-sodium chloride; C-glycerinum; D-sucrose.

黄色葡萄球菌均不能生长,说明金黄色葡萄球菌的生长最低水分活度 $>0.86$ 。水分活度为0.87的3种培养基中,添加甘油的培养基中金黄色葡萄球菌的生长最受抑制,说明甘油相对于氯化钠与蔗糖对金黄色葡萄球菌的生长抑制作用最大。氯化钠与蔗糖介质调节水分活度为0.87的 $T_H$ 组中,金黄色葡萄球菌生长在初始时受到抑制,但当细菌数降到某临界值时又重新开始生长繁殖,说明金黄色葡萄球菌在该2种介质下的生长最低水分活度近似于0.87,需要进一步的实验进行具体确认。烟曲霉在3种介质调节的所有水分活度中,均没有明显生长迹象,说明烟曲霉生长最低水分活度 $>0.83$ 。上述2种微生物的实验结果与美国药典<1112>中收录的代表性微生物生长所需的最低水分活度表不相符。

在使用介质调节培养基较低的水分活度时,

会使用大量的调节介质,从而影响培养基组分,可能造成介质不能溶解、琼脂不能凝固、糖类物质在灭菌时易焦糖化等问题,这些因素对试验的进行和分析会造成较大困扰。微生物是活的生物,其生长因素十分复杂。水分活度是影响微生物生长的重要栅栏因子,同时也与其他栅栏因子如调节水分活度的介质、pH、温度等有协同影响的关系。因此实验设计中单一因子比较难控制,参考美国药典<1112>与相关文献,同种微生物的最低水分活度存在许多不一致。其中,调节介质的影响尤其明显。因此,在验证微生物生长所需的最低水分活度时,应当考虑添加介质对微生物的生长是否有促进或抑制作用,多设置几种添加介质进行比对,结合文献参考分析。尽量将其他条件设置为微生物的生长最佳条件,以水分活度作为变量来研究该微生物生长所需的最低水分活度。

## REFERENCES

- [1] SHENG J F, LI H, MA S H, et al. Application of water activity determination of microbial control in nonsterile pharmaceutical products[J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2018, 38(10): 1837-1841.
- [2] YANG X L, LI H, XU H Y, et al. Application prospect of water activity determination in microbial control of drugs[J]. *China Pharm(中国药业)*, 2018, 27(23): 1-4.
- [3] FRIEDEL R R, CUNDELL A M. The application of water activity measurement to the microbiological attributes testing of nonsterile over-the-counter drug products[J]. *Pharmacoepial Forum*, 1998, 24(2): 6087-6088.
- [4] SCOTT W J. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 °C[J]. *Aust Jnl Bio Sci*, 1953, 6(4): 549.
- [5] SCOTT W J. Water Relations of Food Spoilage Microorganisms[M]. *Advances in Food Research Volume 7*. Amsterdam: Elsevier, 1957: 83-127.
- [6] ROCKLAND L B, BEUCHAT L R. Water Activity: Theory and Applications to Food[M]. New York: Ift Basic Symposium Series, 1987: 119-136.
- [7] DOWNEY W K. Food Quality and Nutrition Research Priorities for Thermal Processing[M]. London: Applied Sciences Publisher, 1978: 553-557.
- [8] CHORDASH R A, POTTER N N. Effects of dehydration through the intermediate moisture range on water activity, microbial growth, and texture of selected foods[J]. *J Milk Food Technol*, 1972, 35(7): 395-398.
- [9] INGHAM S C, SEARLS G, MOHANAN S, et al. Survival of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef jerky and related products stored at 21 °C[J]. *J Food Prot*, 2006, 69(9): 2263-2267.
- [10] The United States Pharmacopeial Convention. USP29 -NF24<1112>[M]. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2006: 3802.
- [11] LI Y. Advancement in researches of *Staphylococcus aureus* and its enterotoxin[J]. *Chin J Heal Lab Technol(中国卫生检验杂志)*, 2004, 14(4): 392-395.
- [12] 王若军, 苗朝华, 张振雄, 等. 中国饲料及饲料原料受霉菌毒素污染的调查报告[J]. *饲料工业*, 2003, 24(7): 53-54.

收稿日期: 2020-12-04

(本文责编: 李艳芳)