

药品霉菌和酵母菌计数替代培养基验证

石琳, 杜蓉, 李学兴

(云南省玉溪市食品药品检验所, 玉溪 653100)

摘要 **目的:** 探讨在非无菌产品微生物限度检查的微生物计数法中, 若因沙氏葡萄糖琼脂培养基上生长的需氧菌使霉菌和酵母菌计数结果不符合微生物限度要求时, 是否可以采用孟加拉红培养基来替代。**方法:** 根据药品微生物检验替代方法验证指导原则验证此方法的准确度、精密度、专属性、定量下限、线性和耐用性。采用参数统计技术来分析以上实验结果。**结果:** 孟加拉红琼脂对霉菌和酵母菌具有专属性; 准确度的回收率均大于 70%; 精密度达到《中华人民共和国药典》2015 年版要求; 定量下限与药典方法无显著差异 ($P>0.05$); 线性相关系数均高于 0.95。以上参数均达到药典要求。**结论:** 当需氧菌生长过多影响霉菌和酵母菌计数时, 可以采用孟加拉红琼脂来代替沙氏葡萄糖琼脂进行霉菌和酵母总数测定。**关键词:** 霉菌和酵母菌计数; 替代方法; 孟加拉红培养基; 回收率; 相对标准偏差; 卡方检验

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2019) 05-0859-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.05.13

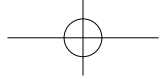
Verification of the substitution culture medium for fungus and yeast count of drugs

SHI Lin, DU Rong, LI Xue-xing

(Yuxi Food and Drug Inspection Institute of Yunnan, Yuxi 653100, China)

Abstracts **Objective:** To discuss whether rose Bengal medium could be used if the aerobic bacteria grown on the Sabouraud dextrose agar medium does not meet the microbial limit requirements for mold and yeast counts in the microbial counting method for microbiological limit inspection of non-sterile products. **Method:** The accuracy, precision, specificity, limit of quantitation, linearity and durability of the method were verified according to verification guideline for alternative methods of microbiological testing of drugs. The experimental results were analyzed by parametric statistical methods. **Results:** Rose Bengal agar was specific to fungi and yeasts. The recovery rate of accuracy was greater than 70%. The precision met the requirements of Chinese Pharmacopoeia. The limit of quantitation was not significantly different from that of the method of Chinese Pharmacopoeia ($P>0.05$). The linear correlation coefficient was higher than 0.95. The above parameters all met the requirements of the Pharmacopoeia. **Conclusion:** when the excessive growth of aerobic bacteria affects mold and yeast count, the rose Bengal medium can be a substitute of the sabouraud dextrose agar to determine the mold and yeast count. **Keywords:** mold and yeast count; substitution methods; rose Bengal medium; recovery rate; RSD; Chi-square test

第一作者 Tel: (0877) 2015137; E-mail: 237885165@qq.com



《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2015年版通则1105非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法,其在结果判断中指出若因沙氏葡萄糖琼脂培养基上生长的细菌使霉菌和酵母菌计数结果不符合微生物限度要求,可采用含抗生素的沙氏葡萄糖琼脂培养基或其他选择性培养基进行霉菌和酵母菌总数测定^{[1]144}。孟加拉红培养基常用于化妆品的霉菌和酵母菌计数^[2],其组分与沙氏葡萄糖琼脂培养基比较,除了缓冲剂、微量元素、凝固剂和供微生物生长必须的碳源、氮源及能源,其中每1 L还含有0.1 g 氯霉素和0.033 g 孟加拉红。氯霉素为广谱抗生素,可以抑制细菌的生长;孟加拉红为选择性抑菌剂,其不但可以抑制细菌生长,还能减缓霉菌因生长过快导致的菌落蔓延。而沙氏葡萄糖琼脂培养基没有选择性,细菌同样可以生长,如果大量细菌、霉菌和酵母菌同时在沙氏葡萄糖琼脂培养基上生长,则无法排除细菌干扰,导致霉菌和酵母菌计数不准确。根据《中国药典》2015年版通则9201药品微生物检验替代方法验证指导原则^{[1]385},本试验对孟加拉红培养基代替沙氏葡萄糖琼脂的方法进行验证。

1 试验材料

1.1 菌株 金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26 003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10 104]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63 501]、白色念珠菌[CMCC(F)98 001]、黑曲霉[CMCC(F)98 003]均由中国食品药品检定研究院提供。菌液制备:取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌的新鲜培养物适量,用pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液制成适宜浓度的菌悬液;取黑曲霉的新鲜培养物适量,加入含0.05%吐温80的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液5 mL,将孢子洗脱。吸出孢子悬液至无菌试管中,用上述缓冲液制成适宜浓度的黑曲霉孢子悬液。

1.2 培养基及材料 孟加拉红培养基(广东环凯微生物科技有限公司,批号3104590,简称1号),孟加拉红培养基(北京三药科技开发公司,批号1707032,简称2号),pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液(广东环凯微生物科技有限公司,批号3104781),沙氏葡萄糖琼脂培养基(北京三药科技开发公司,批号1702244,简称SDA)。

1.3 仪器设备 BHC-1300 II A2型生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司),SPX-150型生化培养箱(慧科电子有限公司)。

2 方法与结果

2.1 专属性 制备金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞

菌、枯草芽孢杆菌高浓度的菌液,预期菌液浓度在 $10^4 \sim 10^5$ cfu·mL⁻¹之间(金黄色葡萄球菌3次平行试验浓度分别为80 000、95 000、73 000 cfu·mL⁻¹;铜绿假单胞菌3次平行试验浓度分别为43 000、55 000、68 000 cfu·mL⁻¹;枯草芽孢杆菌3次平行试验浓度分别为52 000、65 000、69 000 cfu·mL⁻¹)。制备白色念珠菌菌液和黑曲霉孢子悬液,预期菌液浓度在 $10^2 \sim 10^3$ cfu·mL⁻¹之间(白色念珠菌3次平行试验浓度分别为260、350、750 cfu·mL⁻¹;黑曲霉3次平行试验浓度分别为670、500、280 cfu·mL⁻¹)。取上述5种菌液0.1 mL,分别涂布接种于孟加拉红琼脂平板上,于25℃培养2 d。平行试验3次。结果高浓度的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌在孟加拉红培养基上均不生长;白色念珠菌和黑曲霉在孟加拉红培养基上生长良好。表明孟加拉红培养基对霉菌和酵母菌具有专属性。

2.2 准确度 分别制备预期浓度为200 cfu·mL⁻¹的白色念珠菌菌液和预期浓度为100 cfu·mL⁻¹黑曲霉孢子悬液。分别取白色念珠菌菌液(0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL)加入培养皿中,每个体积平行制备10个培养皿;分别取黑曲霉孢子悬液(0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL)加入培养皿中,每个体积平行制备10个培养皿;其中5个倾注孟加拉红培养基,另外5个倾注沙氏葡萄糖琼脂,于25℃培养2 d。平行试验3次。取3次试验的平均值计算回收率(替代方法/药典方法)来评价替代方法的准确度。结果见表1。回收率均大于70%,满足药典要求。

2.3 精密度 分别制备预期浓度为5 000 cfu·mL⁻¹金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌菌液。取上述3种菌液等量混合制成混合菌液(混合菌液的预期浓度为5 000 cfu·mL⁻¹);制备预期浓度为200 cfu·mL⁻¹的白色念珠菌菌液和预期浓度为100 cfu·mL⁻¹的黑曲霉孢子悬液。分别取白色念珠菌菌液(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL)和黑曲霉孢子悬液(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL)加入培养皿中,每个浓度制备10个平皿。在各个平皿中精密加入1.0 mL的混合菌液,准确注入15 mL孟加拉红培养基,混合均匀,于25℃培养2 d。平行试验3次。取3次试验平均值计算RSD,结果见表2。根据《中国药典》对不同含菌浓度下RSD的规定(<10 cfu·皿⁻¹, RSD应<35%;10~30 cfu·皿⁻¹, RSD应<25%;30~300 cfu·皿⁻¹, RSD应<15%),使用替代培养基对霉菌和酵母菌进行计数的精密度达到药典要求。

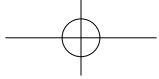


表 1 准确度验证结果

Tab. 1 Verification result of accuracy

白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)				黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)			
预期菌落数 (expected colony number)/cfu	计数结果 (counting result)/cfu		回收率 (recovery)/%	预期菌落数 (expected colony number)/cfu	计数结果 (counting result)/cfu		回收率 (recovery)/%
	孟加拉红 (rose Bengal)	SDA			孟加拉红 (rose Bengal)	SDA	
20	16	17	94	10	12	11	109
60	56	60	93	30	29	32	91
100	108	120	90	50	48	52	92
140	147	163	90	70	67	65	103
180	216	208	104	90	98	100	98

表 2 精密度验证结果

Tab. 2 Verification results for precision

白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)		黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	
预期菌落数 (expected colony number)/cfu	RSD/%	预期菌落数 (expected colony number)/cfu	RSD/%
11	17	17	15
29	9	32	7
58	12	56	10
110	10	74	15
190	9	99	7

2.4 定量下限 分别制备预期浓度为 $50 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的白色念珠菌菌液和黑曲孢子悬菌液。分别取白色念珠菌菌液 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL) 和黑曲霉孢子悬液 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL) 加入培养皿中,每

个体积平行制备 10 个平皿。然后在其中 5 个平皿中各加入孟加拉红培养基 15 mL; 在另外 5 个平皿中各加入沙氏葡萄糖琼脂培养基 (SDA) 15 mL, 于 25°C 培养 2 d。平行试验 3 次, 3 次试验的平均菌落数见表 3, 对表 3 数据进行 t 检验分析, 结果见表 4。

表 3 定量下限结果 (cfu)

Tab. 3 Results of quantitation limit

白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)/cfu		黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	
孟加拉红 (rose Bengal)	SDA	孟加拉红 (rose Bengal)	SDA
9	9	7	7
18	17	16	17
24	23	23	23
36	36	33	35
42	41	46	46

表 4 定量下限均值检验表

Tab. 4 Table of the mean values quantitation limit

菌种 (bacteria)	均值 (mean value)	SD	均数差值 95% 的置信区间 (confidence interval with the RD 95%)		<i>t</i>	<i>P</i>
			上限 (upper limit)	下限 (lower limit)		
白色念珠菌 (孟加拉红) [<i>Candida albicans</i> (rose Bengal)]	0.6	0.547 72	-0.08	1.28	2.449	0.07
白色念珠菌 (SDA) [<i>Candida albicans</i> (SDA)]						
黑曲霉 (孟加拉红) [<i>Aspergillus niger</i> (rose Bengal)]	-0.6	0.894 43	-1.71	0.51	-1.500	0.208
黑曲霉 (SDA) [<i>Aspergillus niger</i> (SDA)]						

由表 3、4 可得, 白色念珠菌组的 T 值为 2.449, P 值为 $0.07 > 0.05$, 可以认为 2 种培养基对白色念珠菌的计数结果无显著差异, 符合药典要求。黑曲霉组的 T 值为 -1.500, P 值为 $0.208 > 0.05$, 可以认为 2 种培养基对黑曲霉的计数结果无显著差异, 符合药典要求。

2.5 线性 分别制备预期浓度为 $200 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的白色念珠菌菌液和预期浓度为 $100 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黑曲

霉孢子悬液, 分别取白色念珠菌菌液 (0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL) 和黑曲霉孢子悬液 (0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL) 加入培养皿中, 每个体积制备 5 个平皿。在各个平皿中注入孟加拉红培养基 15 mL, 混合均匀, 于 25°C 培养 2 d。平行试验 3 次。取 3 次试验的平均值进行线性回归分析, 结果见图 1。2 种验证菌的相关系数均高于 0.95, 满足药典对替代方法的要求。

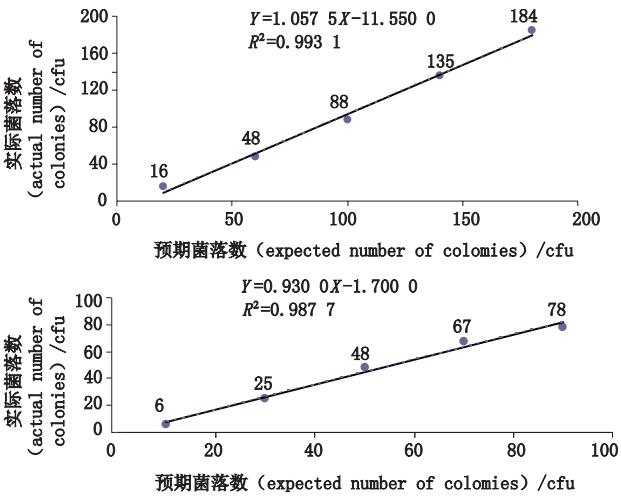


图 1 孟加拉红白色念珠菌 (A) 和黑曲霉 (B) 回归曲线
Fig. 1 Linear regressions of *Candida albicans* (A) and *Aspergillus niger* (B) of rose Bengal

2.6 检测下限、范围 《中国药典》没有要求对替代方法定量检验的检测下限进行验证,但经过多次试验得出在 90 mm 的平板上能够准确计数的白色念珠菌菌落数在 200 cfu 以内,黑曲霉菌落数在 100 cfu 以内。当菌液浓度达到 $5\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下时计数结果与理论浓度的比值无法达到 70%,这与测定方法的关系不大,主要是由于菌落计数服从泊松分布造成的^[3]。

2.7 重现性 参照“2.3”项精密度验证试验方法,第 1 次试验采用 1 号孟加拉红培养基和 SDA 培养基;第 2 次试验采用 2 号孟加拉红培养基和 SDA 培养基。培养计数后计算 RSD,结果见表 5,对表 5 数据进行 *t* 检验分析,结果见表 6。

表 5 重现性验证结果 RSD(%)

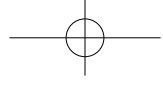
Tab. 5 Verification results for reproducibility of RSD

第一次试验 (the first test)				第二次试验 (the second test)			
白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)		黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)		白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)		黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	
1 号	SDA1	1 号	SDA1	2 号	SDA2	2 号	SDA2
20	18	17	14	17	17	21	20
15	12	11	12	8	7	15	13
7	6	10	8	9	6	12	11
13	11	13	7	10	9	11	10
10	8	9	9	11	11	9	9

表 6 重现性均值检验表

Tab. 6 Table for test of mean values of reproducibility

(I) 分组 (grouping)	(J) 分组 (grouping)	均值差 (mean difference) (I-J)	SD	95% 置信区间 (95% confidence interval)		P
				下限	上限	
				(lower limit)	(upper limit)	
白色念珠菌 1 (<i>Candida albicans</i> 1)	白色念珠菌 2 (<i>Candida albicans</i> 2)	0.020 00	0.027 75	-0.038 8	0.078 8	0.481
	白色念珠菌 SDA1 (<i>Candida albicans</i> SDA1)	0.020 00	0.027 75	-0.038 8	0.078 8	0.481
	白色念珠菌 SDA2 (<i>Candida albicans</i> SDA2)	0.030 00	0.027 75	-0.028 8	0.088 8	0.296
白色念珠菌 2 (<i>Candida albicans</i> 2)	白色念珠菌 SDA1 (<i>Candida albicans</i> SDA1)	0.000 00	0.027 75	-0.058 8	0.058 8	1.000
	白色念珠菌 SDA2 (<i>Candida albicans</i> SDA2)	0.010 00	0.027 75	-0.048 8	0.068 8	0.723
	白色念珠菌 SDA1 (<i>Candida albicans</i> SDA1)	0.010 00	0.027 75	-0.048 8	0.068 8	0.723
黑曲霉 1 (<i>Aspergillus niger</i> 1)	黑曲霉 2 (<i>Aspergillus niger</i> 2)	-0.016 00	0.024 41	-0.067 8	0.035 8	0.522
	黑曲霉 SDA1 (<i>Aspergillus niger</i> SDA1)	0.020 00	0.024 41	-0.031 8	0.071 8	0.425
	黑曲霉 SDA2 (<i>Aspergillus niger</i> SDA2)	-0.006 00	0.024 41	-0.057 8	0.045 8	0.809
黑曲霉 2 (<i>Aspergillus niger</i> 2)	黑曲霉 SDA1 (<i>Aspergillus niger</i> SDA1)	0.036 00	0.024 41	-0.015 8	0.087 8	0.160
	黑曲霉 SDA2 (<i>Aspergillus niger</i> SDA2)	0.010 00	0.024 41	-0.041 8	0.061 8	0.688
	黑曲霉 SDA1 (<i>Aspergillus niger</i> SDA1)	-0.026 00	0.024 41	-0.077 8	0.025 8	0.303



白色念珠菌(1号孟加拉红培养基)与白色念珠菌(2号孟加拉红培养基)、白色念珠菌(SDA1)、白色念珠菌(SDA2)的均值差对应的 P 值均大于0.05,说明4个均值之间均无显著性差异;黑曲霉(1号孟加拉红培养基)与黑曲霉(2号孟加拉红培养基)、黑曲霉(SDA1)、黑曲霉(SDA2)的均值差对应的 P 值均大于0.05,说明4个均值之间均无显著性差异;由不同人员,使用不同厂家的孟加拉红培养基对霉菌和酵母菌计数,并与药典方法进行比较,2次试验结果无显著性差异,重现性符合药典要求。

3 讨论

霉菌、酵母菌在培养40~48 h生长达到峰值,后期由于霉菌菌丝蔓延和覆盖,不利于2种菌落的观察及点计,应及时观察并记录培养至第5 d的结果^[4]。25℃的培养温度下,48 h时白色念珠菌已经较大,且黑曲霉菌丝还没有蔓延,孢子尚未长出,适宜观察。培养时间为5 d的霉菌计数大于或等于培养时间为3 d的霉菌计数,延长培养时间更有利药品霉菌数据的准确性^[5],所以选择适宜的观察及计数时间可以减小计数结果的误差。白色念珠菌在孟加拉红培养基上呈淡粉红色,黑曲霉在孟加拉红培养基上菌落中心可被染成浅红色,两者在孟加拉红培养基上都较SDA容易计数。由于加入的孟加拉红培养基体积与氯霉素含量相关,理论上应当加入相等体积的孟加拉红培养基才能得到较好的精密度。在重现性验证的2次试验中都用了同一份混合菌液,由于取样时间不同,混合菌落总数发生了改变,这一方法参数的改变没有影响检验结果,此替代方法的耐用性也被看作符合药典要求。

国内外目前对霉菌、酵母菌的检测方法除了平板计数法外,还有干片培养法、荧光分析法、微生物活性测定法、近红外光谱检测法和高光谱成像检测法等^[6]。各种方法各有所长,但是平板计数法仍然是最简便耐用的方法。孟加拉红琼脂培养基是市售的成品培养基,方便易得,避免了抗生素加入时混合不均等问题。在霉菌和酵母菌的培养基中还可以考虑加入0.15%表面活性剂吐温20^[7]、用L型涂布棒接种^[8]以及正置培养^[9]等来优化方法。此外GB/T 27025-2008《检测和校准实验室能力的通用要求》^[10]和CNAS-CL01-A001:2018《检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明》^[11]均提出应对测量结果进行适当的不确定度评估。实际检测

中还应建立合适的不确定度评估方法,以便更客观科学地判定实验结果。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015: 144, 385
ChP 2015. Vol IV[S]. 2015: 114, 385
- [2] 化妆品安全技术规范 2015 年版[S]. 2016: 483
Safety Technical Specification for Cosmetics, 2015[S]. 2016: 483
- [3] 王知坚, 李珏. 厄多司坦胶囊菌落计数替代方法的验证[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(1): 2146
WANG ZJ, LI Y. Validation of alternative bacterial count method of erdosteine capsules[J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(1): 2146
- [4] 马群飞. GB 4789. 15—2016《食品安全国家标准—食品微生物学检验霉菌和酵母计数》标准解读[J]. 中国卫生标准管理, 2018, 9(5): 1
MA QF. Interpretation for GB 4789. 15—2016 national food safety standard—food microbiological examination—enumeration of moulds and yeasts[J]. China Health Stand Manage, 2018, 9(5): 1
- [5] 吴美华. 对中国药典微生物限度霉菌和指示菌检查的探索[J]. 海峡药学, 2005, 17(2): 81
WU MH. A study on the examination of microbial limit mould and indicator bacteria in Chinese Pharmacopoeia[J]. Strait Pharm J, 2005, 17(2): 81
- [6] 周玉庭, 任佳丽, 张紫莺. 粮食中霉菌污染检测方法现状及发展趋势[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(1): 244
ZHOU YT, REN JL, ZHANG ZY. Current situation and development trends of detection methods for mold contamination in grains[J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(1): 244
- [7] 邵敏, 赵然, 周鹤峰. 霉菌检测培养基改良实验研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 331
SHAO M, ZHAO R, ZHOU HF. Study on the improvement of medium for mold inspection[J]. Sci Technol Food Ind, 2010, 20(2): 331
- [8] 明儒成, 封新平. 食品中酵母菌计数检验方法的改进[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(3): 478
MING RC, FENG XP. Research on method of counting and testing yeast in food[J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(3): 478
- [9] 梁美丹, 肖剑, 易云婷. 食品微生物能力验证霉菌酵母菌计数[J]. 轻工科技, 2015, 7(7): 5
LIAN MD, XIAO J, YI YT. The ability of food microorganism to verify the count of mold yeast[J]. Light Ind Sci Technol, 2015, 7(7): 5
- [10] GB/T 27025-2008 检测和校准实验室能力的通用要求[S]. 2008
GB/T 27025-2008 General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories[S]. 2008
- [11] CNAS-CL01-A001: 2018 检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明[S]. 2018
CNAS-CL01-A001: 2018 Application of Test and Calibration Laboratory Competency Accreditation Criteria in Microbial Testing[S]. 2018

(本文于2018年3月29日收到)