

关于蜡样芽孢杆菌片活菌数测定和杂菌检查方法的研究

陈伟盛¹, 简敏霁¹, 刘瑜¹, 郑小玲² (1. 广州市药品检验所, 广州 510160; 2. 浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要:目的 对蜡样芽孢杆菌片现行标准中活菌数测定方法以及杂菌检查法的合理性进行探讨,并对这两法进行优化。方法 对影响活菌数测定的因素,如培养基、稀释剂、稀释倍数、前处理方法,进行比较分析,选择较优的实验条件。使用微生物活菌制品总论下的杂菌检查法替代标准中的微生物限度检查法,并对其适用性进行研究。结果 优化后的活菌数测定方法可以更加有效地复苏样品中的蜡样芽孢杆菌,结果明显高于现行标准方法。采用新的杂菌检查法能检出非致病性杂菌,发现样品可能存在风险,其适用性结果基本符合《中国药典》的要求。结论 新方法适用于蜡样芽孢杆菌片活菌数测定和杂菌检查。现行标准中的活菌数测定法以及微生物限度检查不能很好地监测产品的质量风险,建议对方法进行修订,这样既可以更有效地监管产品,又可以更好地帮助生产企业提高产品质量。

关键词:微生态活菌制剂; 杂菌检查; 活菌数测定; 辐射

doi:10.11669/cpj.2024.09.010 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)09-0840-05

Methods for Examining Viable Bacterial Count and Contaminating Bacteria of *Bacillus cereus* Tablets

CHEN Weisheng¹, JIAN Minqian¹, LIU Yu¹, ZHENG Xiaoling² (1. Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China; 2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To discuss the rationality of the current methods for examining viable bacterial count and contaminating bacteria in the standard of *Bacillus cereus* tablets, and optimize the two methods. **METHODS** The factors that affect the method for viable bacterial count were compared and analyzed, such as medium, diluent, dilution ratio, and pre-treatment, then the optimal experimental conditions were selected. The microbial limit test in the current standard was replaced with the contaminating bacteria test under the general chapter for probiotic in Chinese Pharmacopoeia part III, and its suitability was studied. **RESULTS** The optimized method for determination of viable bacterial count could more effectively recover *Bacillus cereus* in the sample, and the results were significantly higher than the current standard method. The use of a new method for detecting non-pathogenic bacteria can discover potential risks in the sample, and its suitability investigation results basically met the requirements of the Chinese Pharmacopoeia. **CONCLUSION** The new methods are suitable for the determination of viable bacterial count and detection of contaminating bacteria in *Bacillus cereus* tablets. The current standards for the determination of viable bacterial count and microbial limit testing cannot effectively monitor product quality risks. It is recommended to revise the methods. This can not only more effectively regulate products, but also better assist manufacturers in improving product quality.

KEY WORDS: probiotic; contaminating bacteria; viable bacterial count; radiation

微生态活菌制品,也称微生态制剂,是一类生物制品。根据资料显示,在临床上有很多微生态活菌制品与常规药物联合应用的案例,对儿童、老年人疾病的治疗有显著效果,提高了治疗质量^[1]。蜡样芽孢杆菌片,又称蜡样芽孢杆菌活菌片,该产品的有效成分为蜡样芽孢杆菌,该菌的作用主要包括抑菌功能、抗炎作用以及促生长作用,属于微生态活菌制品,常用于婴幼儿腹泻、慢性腹泻、肠功能紊乱及肠炎的治疗。蜡样芽孢杆菌片为我国批准上市的微生态制剂之一,目前使用的标准为 WS-10001-(HD-0901)-2002,起草时间为 2002 年。而《中国药典》已

经更新至 2020 年版,其标准面临修订与更新以适应新版药典体系,提高药品用药安全。

评价微生态活菌制品质量的两个重要指标分别活菌数和杂菌。活菌数测定结果可以表示其效力^[2],杂菌检查是微生态活菌制品安全指标之一。2020 年版《中国药典》三部微生态活菌制品总论项下附录 2 和 3 分别列出了微生态活菌制品活菌数测定法和杂菌检查法的基本规定,但是没有针对具体品种提出具体的检测方法^[3]。本研究对现行标准中的活菌数测定法和杂菌检查方法进行优化,并就发现的问题进行探讨。

基金项目:广州市科技计划项目资助(202201011615);浙江省药品监督管理局科技计划项目资助(2023011)

作者简介:陈伟盛,男,硕士,副主任药师 研究方向:分子生物学、药品分析、微生物检验 Tel:(020)81245120

1 仪器与试剂

1.1 仪器

IGS180 培养箱、1378 型生物安全柜(美国 Thermo 公司);MIR-254 低温培养箱(日本 Panasonic 公司);HTY-761 匀浆仪(杭州泰林有限公司);PM200 电子天平(梅特勒-托利多国际有限公司)。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、乙型副伤寒沙门菌[CMCC(B)50094]、福氏志贺菌[CMCC(B)51571]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003],以上菌株均来自中国食品药品检定研究院。

1.3 试剂及培养基

脱氧胆酸钠(麦克林, D6128-10g)、胰酪大豆胨液体培养基(2001092)、NAC 液体培养基(2003022)、胆盐乳糖培养基(1806072)、7.5%氯化钠肉汤培养基(190215)、NAC 琼脂培养基(180719)、曙红亚甲基蓝琼脂培养基(190103)、沙门、志贺菌属琼脂培养基(190625)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(200901)、玫瑰红纳琼脂培养基(180607)(北京三药科技开发公司);血琼脂平板(201221)、孟加拉红琼脂培养基(190926)(北京路桥技术股份有限公司)。

1.4 样品情况

标准提高项目,样品来源于函调样品,由生产企业 A 提供,共计 3 批样品,其批次为:190825;190829;190831。

2 方法

2.1 活菌数测定

现行标准 WS-100010(HD-0901)-2002 活菌计数测定采用常规的 10 倍稀释法,稀释剂为生理盐水,采用 0.1 mL 涂布法,测定培养基是血琼脂培养基。2020 年版《中国药典》三部微生态活菌制品总论采用的活菌数测定培养基为营养琼脂,首先比对不同培养基的测定结果差异。由于蜡样芽孢杆菌一般以芽孢休眠体存在于样品中,因此还要考察稀释液、热处理(热激活)对计数结果的影响。

2.2 杂菌检查法

按照 2020 年版《中国药典》三部微生态活菌制品总论的杂菌检查方法对样品进行杂菌检查,考察不同培养基对杂菌检查结果的影响,同时按照 2020 年版《中国药典》三部微生态活菌制品总论的要求

进行培养基适用性以及阳性对照的实验。

3 结果

3.1 活菌数测定结果

首先考察血琼脂培养基和营养琼脂培养基对活菌数测定结果的影响,3 批样品结果为:①血琼脂培养基: 6.3×10^8 、 7.8×10^8 、 1.0×10^9 cfu · g⁻¹;②营养琼脂培养基: 8.1×10^8 、 1.0×10^9 、 1.1×10^9 cfu · g⁻¹。从测定结果可以看出,两种培养基的活菌数测定结果基本一致,但是根据培养基上的形态结果,血琼脂培养基上的蜡样芽孢杆菌有明显的溶血圈,菌落容易识别,因此认为现行标准的血琼脂培养基更加适合活菌数测定。

接着考察不同稀释液以及是否热激活对活菌数测定结果的影响,热激活处理条件参照 2020 年版《中国药典》四部通则 9208,选择 80 °C × 10 min。结果见表 1。含 0.3% 卵磷脂的生理盐水和经过热激活处理的活菌数测定结果基本一致,而且明显高于生理盐水的活菌数测定结果。说明活菌数测定适宜采用含有 0.3% 卵磷脂的生理盐水作为稀释剂或对 1:10 供试液进行激活处理。

表 1 蜡样芽孢杆菌片不同处理条件下活菌数测定比较

Tab. 1 Comparison of viable bacterial count in *Bacillus cereus* tablets under different pre-treatment conditions

Batch No.	Different pre-treatment viable bacterial count/cfu · g ⁻¹		
	Saline group	0.3% Lecithin-saline group	Heat treatment saline group
190825	7.6×10^8	1.7×10^9	1.5×10^9
190829	8.4×10^8	1.3×10^9	1.6×10^9
190831	7.2×10^8	2.1×10^9	1.9×10^9

在活菌数测定实验中发现蜡样芽孢杆菌生长具有蔓延性,平皿菌落数量最好控制在 100 左右,超过 100 个时由于蔓延生长会导致计数困难。因此对常规 10 倍稀释进行了调整,在制备 1:10 供试液后,取 5 mL 供试液至 100 mL,制成 5:100 供试液,然后再进行 10 倍稀释。不同稀释方法比较结果见表 2。

表 2 不同稀释方法下蜡样芽孢杆菌的活菌数测定比较

Tab. 2 Comparison of viable count of *Bacillus cereus* under different dilutions

Batch No.	Plate colony count at different dilutions/cfu			
	1:10 ⁶	1:10 ⁷	5:10 ⁷	5:10 ⁸
190825	213	19	87	12
190829	156	16	64	13
190831	223	20	104	9

3.2 杂菌检查结果

现行标准 WS-100010 (HD-0901)-2002 参照微生物限度进行,不进行细菌总数检查,仅规定霉菌数每克不得过 100 个,不得检出大肠埃希菌。但是按照 2020 年版《中国药典》三部生态活菌制品总论附录 1,该样品属于微生态活菌制剂,应该进行杂菌检查,而不是微生物限度检查,因此参考 2020 年版《中国药典》三部微生态活菌制品总论进行杂菌检查。

3.2.1 控制菌 根据微生态活菌制品总论的限度要求,口服制剂的控制菌需要检查大肠埃希菌、志贺菌、沙门菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌。检查控制菌的培养基均进行了培养基适用性检查,结果

均符合《中国药典》要求。在进行样品检验时,按照《中国药典》要求,需要加入阳性对照,样品检查结果及阳性对照结果见表 3。根据检查结果,3 批样品均未检出规定的控制菌,但是在金黄色葡萄球菌的检查中,阳性对照并没有全部检出相应的阳性菌,只有 1 个批次的样品检出金黄色葡萄球菌,同时在 3 批次的金黄色葡萄球菌的选择性培养基上均能观察到蜡样芽孢杆菌。说明蜡样芽孢菌一定程度抑制了金黄色葡萄球菌的生长,从而导致了只有 1 批次的阳性对照检出金黄色葡萄球菌。在其余的控制菌选择性培养基上均未观察到蜡样芽孢杆菌的生长,说明其他选择性培养基能很好地抑制蜡样芽孢杆菌生长。

表 3 蜡样芽孢杆菌片控制菌检查结果

Tab. 3 Result of specified microorganisms of *Bacillus cereus* tablets

Specified microorganisms	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella Fuchii</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Enrichment medium	Turbidity	Turbidity	Turbidity	Turbidity	Turbidity
Selective agar medium	- , - , -	- , - , -	- , - , -	- , - , -	<i>Bacillus cereus</i> ¹⁾
Positive control	+ , + , +	+ , + , +	+ , + , +	+ , + , +	+ , - ¹⁾ , - ¹⁾

注: ¹⁾只能观察到蜡样芽孢杆菌,无金黄色葡萄球菌。

Note: ¹⁾only *Bacillus cereus* can be observed, no *Staphylococcus aureus*.

3.2.2 非致病性杂菌 非致病性杂菌的检查,《中国药典》一般选用营养琼脂。但是检查过程中发现营养琼脂上的蜡样芽孢杆菌蔓延生长,其观察结果为无杂菌生长,无对照菌(金黄色葡萄球菌)生长。从结果可以得知,蜡样芽孢杆菌抑制金黄色葡萄球菌的生长。根据《中国药典》要求,大量活菌干扰杂菌检查时,也可以使用其他经验证的培养基。

参考控制菌检查结果,对控制菌选择性培养基配方进行分析,发现质量分数 7.5% 的氯化钠以及 0.9 g · L⁻¹ 脱氧胆酸对蜡样芽孢杆菌有一定的抑制作用,因此考察甘露醇氯化钠琼脂培养基以及 0.9 g · L⁻¹ 脱氧胆酸营养琼脂培养基的培养基适用性,结果见表 4。根据结果,两种培养基均无法全部满足中国药典培养基适用性的要求,但是两种培养基合并使用,可以满足《中国药典》培养基适用性的要求。于是采用同时使用两种培养基合并计数的方法对样品的非致病性杂菌进行检查,甘露醇氯化钠琼脂培养基以金黄色葡萄球菌为阳性对照菌,0.9 g · L⁻¹ 脱氧胆酸营养琼脂培养基以大肠埃希菌为阳性对照菌,结果见表 5。根据非致病性杂菌检查结果,样品在甘露醇氯化钠琼脂培养基上观察到杂菌生长,且可以进行计数。

在 0.9 g · L⁻¹ 脱氧胆酸营养琼脂培养基无杂菌生长。阳性对照菌在 0.9 g · L⁻¹ 脱氧胆酸营养琼脂培养基上回收率符合《中国药典》要求,甘露醇氯化钠琼脂培养基只有在 1 000 cfu 的蜡样芽孢杆菌平皿上的回收率符合《中国药典》要求,1:10 供试液涂布的平皿上回收率为 0,但是能观察到零星的金黄色葡萄球菌。

表 4 真菌计数培养基适用性结果

Tab. 4 Medium suitability results in fungal count

Medium	Recovery ratio		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Mannitol salt agar	0.9	0.9	0
0.9 g · L ⁻¹ Deoxycholic acid nutrient agar	0	0	0.7

3.2.3 真菌计数 根据非致病性杂菌的结果,以及文献[3]的记载,蜡样芽孢杆菌属于非苛养型细菌^[4],在一般的生长条件下均能生长,因此在真菌计数时除了采用《中国药典》的玫瑰红钠琼脂培养基外,还使用了含有抗生素的孟加拉红琼脂培养基进行对比,结果见表 6。结果显示,蜡样芽孢杆菌在玫瑰红钠琼脂培养基上有生长,虽然不影响阳性菌的计数,但是由于蜡样芽孢杆菌的生长对真菌计数

会存在一定的干扰,见图 1。孟加拉红琼脂培养基上可以完全抑制蜡样芽孢杆菌的生长,对计数结果

干扰比较少。3 批样品在孟加拉红琼脂培养基均未检出真菌。

表 5 蜡样芽孢杆菌片非致病性杂菌检查结果

Tab. 5 Test results of non-pathogenic contaminating bacteria of *Bacillus cereus* tablets

Medium	Result/cfu · g ⁻¹			Positive rate	
	190825	190829	190831	1:10 Test solution 0.1 mL coating	1 000 cfu <i>Bacillus cereus</i> coating
Mannitol salt agar	5.9 × 10 ⁴	4.4 × 10 ⁴	4.8 × 10 ⁴	0 ¹⁾	0.9
0.9 g · L ⁻¹ Deoxycholic acid nutrient agar	0	0	0	1.2	0.7

注: ¹⁾能观察到零星阳性对照菌。

Note: ¹⁾ Sporadic positive control bacteria can be observed.

表 6 蜡样芽孢杆菌片真菌计数结果

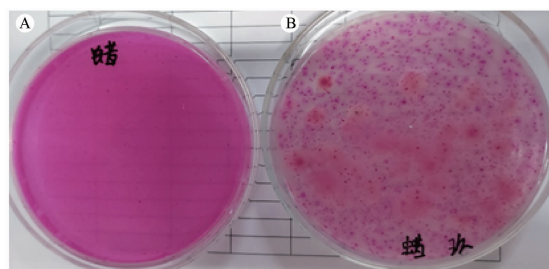
Tab. 6 Fungal count results of *Bacillus cereus* tablets

Medium	Suitability rate	Positive rate
Rose red sodium agar	1.1	1.1
Rose bengal agar	1.1	1.2

3.3 杂菌鉴定结果

48 h 后在蜡样芽孢杆菌表面长出了 3 种形态的小菌落,分别是米白色大颗粒、米白色小颗粒、黄色小颗粒。72 h 后小菌落在平板上的生长更明显,结果见图 2。经革兰染色镜检均为革兰阳性杆菌,结果见图 3。使用 Vitek 2 Compact 全自动生化分析仪进行鉴定,结果显示低鉴别率,无鉴定结果。使用 16S rDNA 测序方法对其进行鉴定,鉴定结果分别为 *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium humireducens*,

Corynebacterium pollutisoli, 均为棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)。通过鉴定结果可知,甘露醇氯化钠琼脂培养基上生长的确实不是蜡样芽孢杆菌。



A - 孟加拉红培养基; B - 玫瑰红钠琼脂培养基。

A - rose bengal agar; B - rose red sodium agar.

图 1 蜡样芽孢杆菌片真菌计数培养基比较图

Fig. 1 Comparison of fungal count media of *Bacillus cereus* tablets

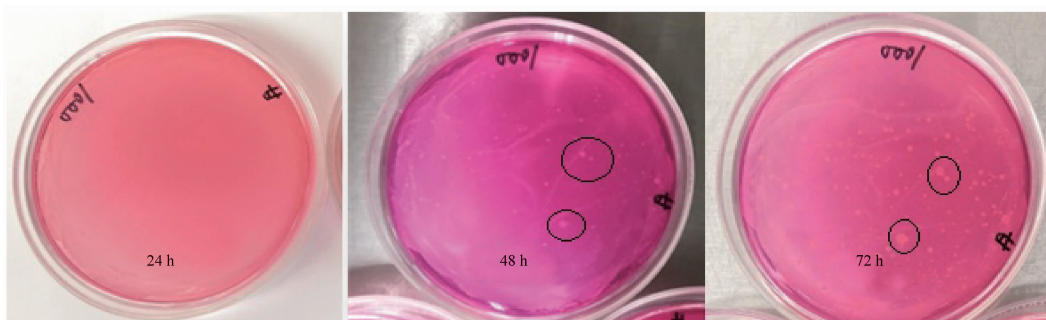


图 2 蜡样芽孢杆菌片样品在甘露醇氯化钠琼脂培养基上培养图

Fig. 2 Figure of *Bacillus cereus* tablets on mannitol salt agar

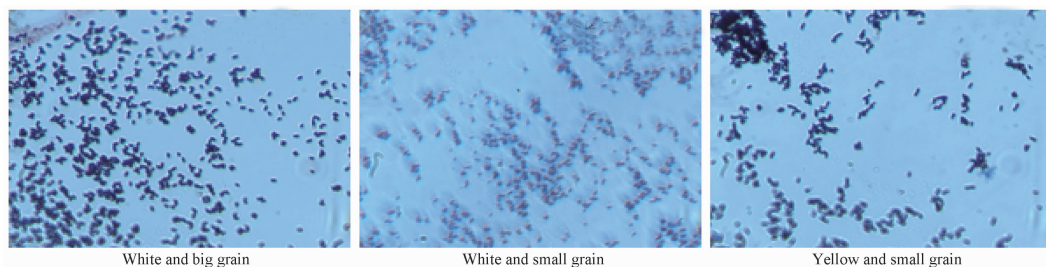


图 3 蜡样芽孢杆菌片甘露醇氯化钠琼脂培养基杂菌镜检图(1 000 ×)

Fig. 3 Microscope figure of contaminating bacteria on mannitol salt agar in *Bacillus cereus* tablets(1 000 ×)

4 讨论与结论

4.1 活菌测定的讨论

蜡样芽孢杆菌一般以休眠体形式存在于制剂中,活菌数测定就是要最大程度地复苏样品中处于休眠状态的蜡样芽孢杆菌。蜡样芽孢杆菌复苏效率越高,活菌测定结果越准确。芽孢的复苏一般可以通过提供良好的培养条件和热激活处理两种方式进行。因此,本研究比较了培养条件以及热激活的处理方法,发现两者结果基本一致。考虑到热激活操作复杂,该品种活菌数测定最终采用0.3%卵磷脂的生理盐水作为稀释剂,血琼脂培养基作为测定培养基的试验方法。新方法复苏效率高于现行标准方法,因此认为新方法优于现行标准方法。

4.2 杂菌检查结果的讨论

蜡样芽孢杆菌片应属于2020年版《中国药典》三部微生态活菌制品总论附录1中已批准上市的微生态活菌制品。其杂菌检查应该按照微生态活菌制品总论附录3进行。微生态活菌制品总论的杂菌检查有3个部分,分别为控制菌、非致病性杂菌和真菌,控制菌检查包括大肠埃希菌、志贺菌、沙门菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌。但是现行标准中的微生物限度仅进行霉菌计数、大肠埃希菌检查,杂菌检查项少于微生态活菌制品总论规定。实验中,在甘露醇氯化钠琼脂培养基上观察到样品存在的杂菌,经鉴定后确认为棒状杆菌属(*Corynebacterium*),其杂菌量超过了《中国药典》的规定限度(不得过 $1\ 000\ \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$),说明该品种确实存在细菌污染的风险,现行标准只进行霉菌计数显然不合理。

在金黄色葡萄球菌检查中发现蜡样芽孢杆菌对金黄色葡萄球菌具有一定的抑制作用,导致阳性对照菌的生长不稳定。在非致病性杂菌检查中也发现类似情况,当采用营养琼脂进行检查时,无法观察到阳性对照菌——金黄色葡萄球菌的生长,这是由于蜡样芽孢杆菌的生长产生了抑菌物质^[6-8]。采用甘露醇氯化钠琼脂培养基以及 $0.9\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱氧胆酸营养琼脂培养基进行非致病性杂菌检查,在甘露醇氯化钠琼脂培养基上虽然回收率为0,但是可以在培养基上观察到零星的金黄色葡萄球菌生长。当平皿中的蜡样芽孢杆菌数调整至约 $1\ 000\ \text{cfu}$ 时,就可以获得理想的回收率,说明甘露醇氯化钠琼脂培养基在一定程度上抑制蜡样芽孢杆菌的生长。通过观察平皿上的菌落形态,发现蜡样芽孢杆菌在甘露醇氯化钠琼脂培养基上的形态明显变小,生长变慢,没有出现营养琼脂上的蔓延生长,加上培养基对金黄

色葡萄球菌有指示作用,所以更加容易观察到阳性对照菌的生长。

由于样品菌为蜡样芽孢杆菌,其抗逆性较强^[9],经实验发现该产品经过3 kGy辐射处理后其活菌数量没有明显变化。说明一般的处理手段比较难以靶向性完全抑制其生长,只能减慢其生长速度,提高其他杂菌的检出率。

对于真菌计数,虽然《中国药典》没有特殊的要求,但是根据上述的实验结果,玫瑰红钠培养基虽然可以回收阳性对照菌,但是蜡样芽孢杆菌的生长在一定程度上还是会影响到计数,因此建议对于蜡样芽孢杆菌片直接采用含有抗生素的孟加拉红培养基进行真菌计数。

4.3 结论及建议

经优化后的方法可以检出样品中的杂菌,发现样品风险,同时阳性对照基本符合《中国药典》的要求,表明经优化的方法适用于该产品的活菌数测定与杂菌检查。同时通过上述实验结果发现,现行标准中的活菌数测定法以及微生物限度检查不能很好地监测产品的质量风险,建议对方法进行修订。这样即可以更有效地监管产品,也可以更好地帮助企业提高产品质量。

REFERENCES

- [1] YUAN L J, LIU A M, LI Y, et al. Application and research progress of microecologies[J]. *Chin J Clin Ratio Drug Use* (临床合理用药杂志), 2018, 11(15):178-181.
- [2] LIU D H. The Advancement of Microecologicals and its clinical application evaluation[J]. *Eval Anal Drug-Use Hosp China* (中国医院用药评价与分析), 2006 (3):139-142.
- [3] ZHENG X L, CHEN S, ZHANG X P, et al. Validation for contaminating microorganisms test in *Bacillus Licheniformis* particles [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2015, 32(3):339-343.
- [4] ZHENG X L, WAN H, CHEN S, et al. A method for live bacteria counting of *Bacillus Licheniformis* particles [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2014, 34(10):1792-1795.
- [5] SUN W J, ZHANG B, LI D K, et al. Development status and clinical application progress of probiotic preparations [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2015, 35(9):850-857.
- [6] LI J X, BEI X, YUAN W Q, et al. Probiotic function and application of non-pathogenic *Bacillus cereus* [J/OL]. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技):1-9 [2023-03-31].
- [7] ZHANG H Y, LIU F, JIANG X F. Stress resistance studies of *Bacillus cereus* [J]. *Gansu Anim Husb Vet* (甘肃畜牧兽医), 2022, 52(3):34-36, 40.
- [8] WANG Y H, ZHENG X L, RUAN H, et al. Detection of staphylococcus aureus in *Bacillus licheniformis* live products by PMA-qPCR [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2022, 57(3):231-236.
- [9] YI Q, XIONG J, LIU X P. Study and verification of the minimum water activity needed for *Bacillus subtilis* growth [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2021, 56(6):497-501.

(收稿日期:2023-07-19)