·监管技术·

屎肠球菌对复方胰酶散微生物计数中试验菌生长的影响

王似锦，蔡春燕，余萌，刘鹏，杨美琴，马仕洪*（中国食品药品检定研究院，北京 100050）

摘要　目的：研究屎肠球菌对复方胰酶散微生物计数方法适用性试验中试验菌生长的影响。**方法：**按照中国药典规定的方法适用性试验方法，分别对含有和不含屎肠球菌的复方胰酶散样品，用倾注法和涂布法进行试验，观察5种试验菌的生长情况，并计算回收率。**结果：**使用倾注法和涂布法，白色念珠菌和黑曲霉的回收率能够达到要求，使用涂布法（0.2 mL·皿$^{-1}$）金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌的回收率能够达到要求。**结论：**初步研究表明，使用倾注法时试验细菌的回收率偏低的原因是屎肠球菌的生长导致琼脂培养基pH值下降，从而抑制了加入的试验细菌的生长。

关键词：屎肠球菌；复方胰酶散；微生物计数

中图分类号：R96　**文献标识码：**A　**文章编号：**1002-7777(2020)10-1186-05
doi:10.16153/j.1002-7777.2020.10.010

Effect of *Enterococcus Faecium* on the Growth of Test Strains in Microbial Counting for Compound Pancreatin Powder

Wang Sijin, Cai Chunyan, Yu Meng, Liu Peng, Yang Meiqin, Ma Shihong* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract　Objective: To study the effect of *enterococcus faecium* on the growth of test strains in the suitability test of microbial counting method for Compound Pancreatin Powder. **Methods:** According to the suitability of the testing method prscribed by *Chinese Pharmacopoeia*, the samples of Compound Pancreatin Powder with or without *enterococcus faecium* were tested by Pour-plate method and Surface-spread method respectively. The growth of five test strains was observed, and the recovery rate was calculated. **Results:** The recovery rates of *candida albicans* and *aspergillus niger* could meet the requirements by Pour-plate method and Surface-spread method. The recovery rates of *staphylococcus aureus*, *bacillus subtilis* and *pseudomonas aeruginosa* could meet the requirements by Surface-spread method (0.2 mL · dish^{-1}). **Conclusion:** The research suggested that the low recovery rate of test strains by Pour-plate method is due to the decrease of pH of agar medium caused by the growth of *enterococcus faecium*, which inhibits the growth of test bacteria.

Keywords: *enterococcus faecium*; Compound Pancreatin Powder; microbial counting method

复方胰酶散为助消化药，收载于《国家药品标准（化学药品地标升国标第九册）》，每包含淀粉酶0.1 g、胰酶0.1 g和乳酶生0.1 g。其中乳酶生[1]为含屎肠球菌（*Enterococcus Faecium*）经培养制成的活菌制剂，每1 g含活屎肠球菌数不少于1.0×10^{7}cfu。本品按照化学药品注册，在其质量标

作者简介：王似锦，副主任药师；E-mail：wsj@nifdc.org.cn
通信作者：马仕洪，主任药师；E-mail：mash@nifdc.org.cn

准中明确应符合《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）2015年版四部通则1107微生物限度标准的要求。

本品微生物计数的方法适用性试验不但会受到其主要成分淀粉酶、胰酶和辅料的影响，也可能会受到本身含有的屎肠球菌生长的影响，因此，本研究以复方胰酶散为例，进行了含活菌制剂的化学药品的微生物限度检查—微生物计数的方法适用性试验，并着重对屎肠球菌生长对试验菌生长的影响及其可能的原因进行了初步探讨。

1 仪器与材料

1.1 仪器

压力蒸汽灭菌锅（日本YAMATO）、KD-240恒温培养箱（德国BINDER）、二级生物安全柜（美国Thermo）、pH计（METTLER TOLEDO Seven Multi）。

1.2 样品

复方胰酶散A（批号：170103，规格：淀粉酶0.1 g、胰酶0.1 g、乳酶生0.1 g）；复方胰酶散B（特制样品，除不含乳酶生外，其余成分与复方胰酶散A一致）。

1.3 培养基和稀释液

培养基：胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA）（美国BD公司，批号：6250646）；沙氏葡萄糖琼脂培养基（SDA）（中国食品药品检定研究院对照培养基，批号：135013-201703）；稀释液：pH7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液（北京三药科技开发有限公司，批号：20171123）。

1.4 菌种

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus Aureus*）[CMCC（B）26 003]、枯草芽孢杆菌（*Bacillus Subtilis*）[CMCC（B）63 501]、大肠埃希菌（*Escherichia Coli*）[CMCC（B）44 102]、白色念珠菌（*Candida Albicans*）[CMCC (F) 98 001]、黑曲霉（*Aspergillus Niger*）[CMCC(F)98 003]均由中国食品药品检定研究院提供。

2 方法与结果

2.1 倾注法（1 mL · 皿$^{-1}$）

取样品10 g，用 pH7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液制成1∶10的供试液。取1∶10的供试液10 mL置试管中，接种0.1 mL的菌液（含1000 cfu左右），混匀，作为试验组。

按照《中国药典》2015年版四部1105 非无菌产品微生物限度检查[2]：微生物计数法的计数方法适用性试验的方法制备供试品对照组和菌液对照组，并进行倾注法（1 mL · 皿$^{-1}$）的方法适用性试验。

2.2 倾注法（0.2 mL · 皿$^{-1}$）和涂布法（0.2 mL · 皿$^{-1}$）

取样品10 g，用pH7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液制成1∶10的供试液。取1∶10的供试液10 mL置试管中，接种0.1 mL的菌液（含5000 cfu左右），混匀，作为试验组。

按照《中国药典》2015年版四部1105 非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法的计数方法适用性试验的方法制备供试品对照组和菌液对照组，并进行倾注法（0.2 mL · 皿$^{-1}$）和涂布法（0.2 mL · 皿$^{-1}$）的方法适用性试验。

2.3 调节TSA的pH值后的倾注法（0.2 mL · 皿$^{-1}$）和涂布法（0.2 mL · 皿$^{-1}$）

取复方胰酶散B样品按照“2.1”和“2.2”节同法操作，使用pH值为5.6和4.7的TSA培养基。同时采用普通TSA培养基（pH=7.1）做菌液组。

2.4 pH值的测定

取“2.1”和“2.2”节中培养之后的平板，测定其琼脂pH值，测量时将平头电极头插入琼脂内部。

2.5 方法适用性试验结果

复方胰酶散A样品和复方胰酶散B样品的方法适用性试验结果见表1。对于复方胰酶散B，采用倾注法（1 mL · 皿$^{-1}$或0.2 mL · 皿$^{-1}$），或涂布法（0.2 mL · 皿$^{-1}$），各菌的回收率均能够达到80%以上，说明不含屎肠球菌，只含有胰酶和淀粉酶以及辅料的复方胰酶散样品采用倾注法和涂布法，对细菌、霉菌和酵母菌均无明显的抑制作用。

对于复方胰酶散A，三种方法[倾注法（1 mL · 皿$^{-1}$或0.2 mL · 皿$^{-1}$），或涂布法（0.2 mL · 皿$^{-1}$）]黑曲霉和白色念珠菌的回收率均能够达到80%以上，说明即使屎肠球菌在SDA培养基中生长，也不影响黑曲霉和白色念珠菌的生长。采用倾注法（1mL · 皿$^{-1}$），3株细菌的回收率均为0；采用0.2 mL · 皿$^{-1}$的倾注法，金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌的回收率分别为4%、47%和7%。如果采用涂布法（0.2 mL · 皿$^{-1}$），则3株细菌的回收率均达到80%以上。观察平板发现，使用倾注法和涂布法，样品中含有的屎肠球菌均能够在

TSA培养基中生长，并且由于屎肠球菌的浓度较高（约10^5 cfu左右），生长呈密密麻麻的细小菌落。

2.6 培养前后琼脂培养基pH的变化

由于在A样品和B样品试验中，细菌回收率的差异较大，两个样品的区别为是否含有屎肠球菌，考虑到屎肠球菌的生长会产酸，因此测定了培养前后琼脂培养基的pH值，结果见表1。B样品的TSA在培养后其pH值并未下降，反而会略有上升，在7.0~7.7之间；而A样品的TSA在培养后pH值则与检验方法有关，倾注法均有不同程度的下降[下降较多的是倾注法（1 mL·皿$^{-1}$），降为4.65，其次是倾注法（0.2 mL·皿$^{-1}$），降为5.61]，而涂布法保持其pH值基本不变。其原因可能是倾注法的屎肠球菌均匀分布于琼脂培养基中间，导致TSA的pH值显著下降；而涂布法的屎肠球菌于琼脂表面生长，其代谢产物并未能影响到琼脂内部，因此，其pH值基本无变化。

2.7 TSA的pH值对细菌回收率的影响

将培养后TSA培养基pH下降的情况，与“2.5”方法适用性试验中的回收率的结果相联系，推测是由于屎肠球菌的生长产酸导致pH值下降，导致细菌的回收率较低，甚至为零。因此，为了印证这一假设，将TSA调节后再使用复方胰酶散B样品进行方法适用性的试验，结果见表2。

表 1 方法适用性试验结果（回收率） %

供试品	方法	需氧菌总数计数						霉菌和酵母菌总数计数		
		培养后TSA的pH值*	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	黑曲霉	白色念珠菌	培养后SDA的pH值*	黑曲霉	白色念珠菌
复方胰酶散A	倾注法（1 mL·皿$^{-1}$）	4.65	0	0	0	86	41	3.75	118	104
	倾注法（0.2 mL·皿$^{-1}$）	5.61	4	47	7	95	61	4.34	105	90
	涂布法（0.2 mL·皿$^{-1}$）	7.18	93	84	90	106	92	5.41	98	98
复方胰酶散B	倾注法（1 mL·皿$^{-1}$）	7.36	101	86	106	109	114	5.70	112	102
	倾注法（0.2 mL·皿$^{-1}$）	7.71	108	94	88	94	91	5.75	117	94
	涂布法（0.2 mL·皿$^{-1}$）	7.06	88	89	112	103	103	5.38	109	110

注：*TSA 培养基在培养前的 pH 值为 7.1~7.2，SDA 培养基在培养前的 pH 值为 5.5~5.6。

表 2 调节 pH 值之后细菌的回收率（B 样品） %

培养基	方法	菌液组 / 试验组	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌
TSA（pH=4.7）	倾注法（1 mL·皿$^{-1}$）	菌液组*	94**	69	40
		试验组	93**	111	36
	倾注法（0.2 mL·皿$^{-1}$）	菌液组	76**	20	14
		试验组	82**	28	14
	涂布法（0.2 mL·皿$^{-1}$）	菌液组	0	0	134
		试验组	0	0	0

续表2

培养基	方法	菌液组 / 试验组	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌
TSA（pH=5.6）	倾注法（1 mL・皿$^{-1}$）	菌液组	96	118	126
		试验组	98	109	145
	倾注法（0.2 mL・皿$^{-1}$）	菌液组	81	143	104
		试验组	75	129	108
	涂布法（0.2 mL・皿$^{-1}$）	菌液组	103	85	136
		试验组	109	105	70

注：* 调节 pH 值的菌落数与 pH=7.1 的 TSA 上的菌落数的比值；** 与 pH=7.1 的 TSA 相比，菌落生长较小。

对于pH值为5.6的TSA来说，3株细菌的回收率均大于50%。pH值调节为4.7的倾注法（1 mL・皿$^{-1}$），铜绿假单胞菌的试验组回收率较低；倾注法（0.2 mL・皿$^{-1}$）枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌的菌液组（pH4.7）和试验组的回收率低；涂布法（0.2 mL・皿$^{-1}$）的3株细菌回收率均较低，甚至为零。使用倾注法，虽然金黄色葡萄球菌的回收率能够达到50%以上，但是，其菌落明显偏小，说明存在一定的抑制作用。

上述试验表明，如果使用低pH值（pH=4.7）的TSA培养基，会影响到细菌的生长，表现为菌落偏小，回收率偏低。

3 讨论

益生菌类药品应属于生物制品，在《中国药典》2015年版三部的微生态活菌制品总论[3]里，对该类制品有制造、生产用菌种、菌粉制造、半成品以及成品的一系列要求，并且在成品检定中列出了活菌数测定和杂菌检查项，前者的目的是测定产品中益生菌的数量是否符合规定，后者的目的是检查成品中外源微生物的污染情况，以保证人体使用安全。对于成品，要求非致病性杂菌不超过1000 cfu・g^{-1}。

美国药典第42版第一增补本中新增了第64章节益生菌检查（*Probiotic Tests*）[4]，其中主要的质量控制要求：活菌的鉴别、活菌计数以及污染菌的检查。欧洲药典从9.7版开始收载生物治疗产品（Live Biotherapeutic Products for Human Use）[5]，所谓生物治疗产品（Live Biotherapeutic Products，LBP），就是含活微生物（细菌或酵母菌）的药品，该章节列出了生物治疗产品的基本要求、菌种的鉴别、种子管理以及污染微生物的检查，对于口服的非液体制剂，要求需氧菌总数不得超过10^3 cfu・g^{-1}，霉菌和酵母菌总数不得超过10^2 cfu・g^{-1}，1 g制剂中不得检出大肠埃希菌。在2.6.36和2.6.38[5]中，详述了生物治疗产品的污染微生物计数和控制菌检查方法，其中在污染微生物计数的方法适用性试验中，要求回收率应达到50%~200%。

目前，国内有部分含益生菌或活菌成分的药品，是按照化学药品注册的，本研究的对象复方胰酶散就是一个典型例子，该产品收载于《国家药品标准（化学药品地标升国标第九册）》，其中规定“应符合散剂项下有关的各项规定”。根据《中国药典》2015年版四部通则0115散剂[2]项下微生物限度的要求，除另有规定外，按照非无菌产品微生物限度检查：微生物计数（通则1105）和控制菌检查法（通则1106）及非无菌药品微生物限度标准（通则1107）[2]检查，应符合规定。因此，本研究针对复方胰酶散在进行微生物限度检查的微生物计数（杂菌检查）中，本身含有的活菌（屎肠球菌）对试验菌生长的影响。

试验结果表明，通过与不含屎肠球菌的样品相比，由于复方胰酶散A中的屎肠球菌的生长，导致了倾注法的回收率较低。进一步试验发现，与涂布法相比，倾注法会使TSA培养基的pH值显著下降。通过调节TSA培养基的pH值，发现低pH值（pH=4.7），会直接抑制细菌的生长，导致生长的菌落偏小以及回收率较低。上述试验表明，如果使用倾注法，会使复方胰酶散A中的屎肠球菌生长，其代谢产物导致TSA培养基pH值显著降低，最终影响到了试验细菌的生长，使回收率不足50%，甚至

无法生长。当然，是否存在其他的代谢产物导致试验细菌无法生长尚不清楚。

复方胰酶散除含有乳酶生（主要成分为屎肠球菌）外，还含有胰酶和淀粉酶，前者是自猪、羊或牛胰腺中提取的多种酶的混合物，主要为胰蛋白酶、胰淀粉酶与胰脂肪酶[1,6]，后者主要来自真菌或细菌的发酵产物[7]。因此，这两种酶原料为动物来源和细菌或真菌发酵所得，其微生物污染的风险较高[8]。《中国药典》2015年版二部收载了胰酶[1]，其检查项下列出了微生物限度检查，要求1 g供试品中需氧菌总数不得超过10000 cfu，霉菌和酵母菌总数不得超过100 cfu，不得检出大肠埃希菌，10 g供试品中不得检出沙门菌。并且两个含有胰酶原料的制剂胰酶肠溶片和胰酶肠溶胶囊，也都有微生物限度的要求，限度标准应符合《中国药典》2015年版四部通则1107非无菌药品微生物限度标准[2]中口服固体制剂的要求。

虽然中国药典微生物限度检查法中收载了平皿法（包括倾注法和涂布法），但是，对一般的化药或中药进行微生物计数，倾注法较为常用，涂布法使用较少。但是，在本研究中发现，如果使用倾注法对含有屎肠球菌的供试品进行微生物计数，其本身所含活菌的生长会导致目标菌无法检出，如果不进行适当的方法适用性研究，会导致假阴性的结果，应引起注意。研究表明，涂布法（0.2 mL·皿$^{-1}$）更适合该品种微生物限度检查的微生物计数。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：二部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：677-678,1170-1171.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：四部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：19-20，149-151.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：三部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：44-50.

[4] USP42 First Supplement[S]. 2019：9014-9015.

[5] EP9.7[S]. 2018：6297-6305，6522-6523.

[6] 郭兆斌，韩玲，刘亮亮，等. 猪胰脏中胰酶的提取工艺优化研究[J]. 食品科学，2009，30（22）：162-164.

[7] 胡荣，方琳琳，付朦，等. 淀粉酶高产菌的筛选、鉴定、诱变及生产优化[J]. 江西师范大学学报（自然科学版），2019，43（5）：496-500.

[8] USP 42[S]. 2019：7695-7701.

（收稿日期 2020年1月20日 编辑 邹宇玲）