

铜绿假单胞菌定量冷冻干燥菌球与新鲜制备菌悬液用于胰酪大豆胨琼脂培养基适用性检查的研究

任河山^{1#}, 李景云^{2#}, 王跃凤¹, 崔生辉², 徐中清^{3*}, 王金恒^{1*} (1. 北京三药科技有限公司, 北京 100050; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 3. 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘要 目的: 探讨使用铜绿假单胞菌CMCC (B) 10104定量冷冻干燥菌球制备菌悬液 (以下简称冻干型菌悬液) 与新鲜制备菌悬液 (以下简称新鲜型菌悬液) 评价胰酪大豆胨琼脂培养基适用性的差异。方法: 将铜绿假单胞菌CMCC (B) 10104冻干型菌悬液和新鲜型菌悬液分别涂布5种市售胰酪大豆胨琼脂培养基, 获得培养物的菌落数量、菌落平均直径及肉眼可见菌落出现时间, 使用SPSS软件进行统计学分析。结果: 铜绿假单胞菌CMCC (B) 10104冻干型菌悬液与新鲜型菌悬液的差异主要体现在菌落平均直径上, 前者大于后者。铜绿假单胞菌CMCC (B) 10104冻干型菌悬液在不同品牌胰酪大豆胨琼脂培养基平板上菌落计数明显不同。结论: 使用铜绿假单胞菌CMCC (B) 10104冻干型菌悬液更利于筛选对损伤菌促生长能力强的培养基, 可以用于计数培养基 (胰酪大豆胨琼脂培养基) 适用性检查。

关键词: 冻干型菌悬液; 新鲜制备菌悬液; 铜绿假单胞菌; 胰酪大豆胨琼脂培养基; 适用性检查

中图分类号: R921.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)12-1397-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.12.009

Study on the Applicability Test of Quantitative Lyophilized Ball and Freshly Prepared Suspension of *Pseudomonas aeruginosa* for the Evaluation of Tryptic Soy Agar

Ren Heshan^{1#}, Li Jingyun^{2#}, Wang Yuefeng¹, Cui Shenghui², Xu Zhongqing^{3*}, Wang Jinheng^{1*} (1. Beijing Sanyao Science and Technology Co., Ltd, Beijing 100050, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 3. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract Objective: To investigate the difference between quantitative lyophilized ball suspension and freshly prepared suspension of *Pseudomonas aeruginosa* CMCC (B) 10104 for evaluating the applicability of Tryptic Soy Agar. **Methods:** Five types of commercially available Tryptic Soy Agar were inoculated with quantitative lyophilized ball suspension and freshly prepared suspension of *Pseudomonas aeruginosa* CMCC (B) 10104 respectively. The number of colonies, average diameter of colonies and appearance time of colonies were obtained. The differences were analyzed by SPSS statistical software. **Results:** The difference between lyophilized ball suspension and freshly prepared suspension of *Pseudomonas aeruginosa* CMCC (B) 10104 was

基金项目: 国家重点研发计划重点专项项目 (编号 2022YFC2303900)

作者简介: 任河山 Tel: (010) 57047857; E-mail: renheshan@nifdc.com

共同第一作者: 李景云 E-mail: Lijy@nifdc.org.cn

通信作者: 徐中清 Tel: 13501071365; E-mail: zhongqingxu@163.com

王金恒 E-mail: wangjinheng@nifdc.org.cn

mainly reflected in the average diameter of colonies. The average diameter of colonies of the lyophilized ball suspension was larger than that of freshly prepared suspension. The colony count of *Pseudomonas aeruginosa* CMCC (B) 10104 lyophilized ball suspension was significantly different on different brands of Tryptic Soy Agar plates. **Conclusion:** Using the lyophilized ball suspension of *Pseudomonas aeruginosa* CMCC (B) 10104 is more conducive to screening the medium with strong growth promoting ability to the damaged bacteria, and could be used to check the applicability of counting medium (Tryptic Soy Agar).

Keywords: lyophilized ball suspension; freshly prepared suspension; *Pseudomonas aeruginosa*; Tryptic Soy Agar; applicability test

特定浓度的菌悬液被用于培养基质量控制、方法适用性检查、抑菌能力测试等药品检验控制活动中。目前,微生物实验室获得菌悬液的方法有2种:一是按照《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)关于菌种及菌液制备要求制备新鲜型菌悬液^[1];二是采用市售定量冷冻干燥菌球,使用复溶液复溶后获得特定浓度的冻干型菌悬液。制备冻干型菌悬液操作方便、计数准确、重复性好,被越来越多的微生物实验室用于制备菌悬液^[2-4]。

一般认为,相同浊度或透光度条件下,冻干型菌悬液的生长能力与新鲜型菌悬液存在差异^[5-7]。有学者研究了铜绿假单胞菌冻干型菌悬液和新鲜型菌悬液在胰酪大豆琼脂培养基(以下简称TSA培养基)的生长情况,认为冻干型菌悬液与新鲜型菌悬液的活性差异会影响培养基的质量评价结果。至于质量评价结果的差异是否更有利于筛选培养基,尚未有确定的判断^[8]。

TSA培养基是药典中需氧菌总数计数用培养基,同时广泛用于多种微生物的培养,其质量对保证药品检验结果至关重要。铜绿假单胞菌CMCC(B)10104是TSA培养基适用性检查的测试菌种之一。本研究通过测算铜绿假单胞菌CMCC(B)10104冻干型菌悬液及新鲜型菌悬液在TSA培养基培养后的菌落数量、菌落平均直径、肉眼可见菌落出现时间3个指标,分析冻干型菌悬液与新鲜型菌悬液的差异,进而探讨冻干型菌悬液评价培养基的可行性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

微生物自动培养及监控分析系统(Read Bio-400,成都若斌生物科技有限责任公司),全自动微生物平皿螺旋加样仪(EDDYJET2, IUL公司),生物安全柜(NU-543-600S, Nuair公司),

压力蒸汽灭菌器(YAMATO SQ 810C,重庆雅马拓科技有限公司),菌落计数仪(Inter Science Scan 4000, Inter Science公司)。

1.2 培养基与试剂

本研究选取3个国产和2个进口品牌的TSA培养基,分别编码为A(批号9050734)、B(批号20201016)、C(批号1095011)、D(批号200827)、E(批号1920021)。其中,A、E为国外公司产品。

如无特殊说明,本研究检验用菌种的培养均使用北京三药科技开发公司生产的TSA培养基(批号2009102)。

1.3 菌种

铜绿假单胞菌CMCC(B)10104标准菌种购自中国医学细菌保藏管理中心。

铜绿假单胞菌CMCC(B)10104定量冷冻干燥菌球产品,含配套复溶液(产品号33303,批号210305,含菌量1000~2000 cfu/颗)来自北京三药科技开发公司。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 新鲜型菌悬液制备

取-70℃保存的铜绿假单胞菌CMCC(B)10104标准储备菌种1管,室温融化后,分区划线TSA培养基,于32~34℃培养22~26 h,为1代菌。从1代培养物上挑取单菌落,再次分区划线于TSA培养基,32~34℃培养22~26 h,为2代菌。用无菌棉签取2代培养物至无菌生理盐水中,混匀,制备1.0麦氏浊度的菌悬液。将制备的菌悬液用无菌生理盐水1:10梯度稀释至 10^{-5} ,即为备用的新鲜型菌悬液。平行制备10份。

2.1.2 冻干型菌悬液制备

从-20℃冰箱取1瓶铜绿假单胞菌CMCC(B)

10104定量冷冻干燥菌球，平衡至室温后，无菌开启西林瓶，加入1.1 mL配套复溶液，即为备用的冻干型菌悬液。平行制备10份。

2.1.3 TSA培养基制备

取5个品牌TSA培养基，按配方要求称量配制，分装成400 mL·瓶⁻¹后，使用同一压力蒸汽灭菌器，同一批次，121 °C灭菌15 min，水浴平衡至49~51 °C后，20 mL·皿⁻¹定量倾注于90 mm直径的无菌平皿备用。

2.1.4 接种、培养及观测

使用全自动微生物平皿螺旋加样仪的E50模式进行螺旋涂布。接种5个品牌市售TSA培养基，每份菌悬液在每个品牌的培养基上涂布2个平皿。涂布前将菌悬液充分混匀，为避免涂布间隔过长造成的菌落计数差异，每份菌悬液在5个品牌培养基上的起止涂布时间控制在6 min内。

将涂布好的TSA平皿置于微生物自动培养及监控分析系统进行培养、记录。培养及拍摄参数为培养温度33 °C，拍照间隔1 h，培养过程中共计拍照24次。依据拍摄图片记录肉眼可见菌落出现时间。

2.1.5 菌落计数、菌落平均直径、肉眼可见菌落出现时间

培养结束后，使用菌落计数仪进行菌落计数，并测量菌落平均直径。对同一品牌TSA培养基2个平行平皿上的菌落数量、菌落平均直径求取平均值，即为该品牌TSA培养基对该份菌悬液的菌落计数及菌落平均直径结果。

菌落平均直径测量原理：菌落平均直径 $d = 2\sqrt{s/n\pi}$ (s 为平皿上菌落总面积； n 为平皿上的菌落数)。

对每份菌悬液在同一品牌TSA培养基2个平行平皿上的肉眼可见菌落出现时间求取平均值，即为该品牌TSA培养基对该份菌悬液的肉眼可见菌落出现时间。

2.1.6 数据处理

使用 SPSS19.0软件进行方差 (Anova) 分析、配对样本 t 检验、独立样本 t 检验和相关分析，显著性水平均为0.05。

2.2 结果

2.2.1 新鲜型和冻干型菌悬液在不同品牌TSA培养基上生长数量

经单因素方差分析显示，铜绿假单胞菌 CMCC (B) 10104冻干型菌悬液在5个品牌TSA培养基上的菌落生长数量存在极显著性差异 ($P < 0.001$)。其中，在进口品牌E培养基上的菌落生长数量极显著高于国产品牌C和D上的生长数量 ($P < 0.001$)，2个进口品牌培养基上菌落生长数量也存在显著性差异 ($P = 0.015$)。新鲜型菌悬液在5个品牌TSA培养基上的菌落生长数量未见显著性差异 ($P = 0.226$)。对在不同品牌培养基上菌落生长数量的变异系数进行配对样本 t 检验分析显示，冻干型菌悬液菌落生长数量的变异系数显著低于新鲜型菌悬液菌落生长数量的变异系数 ($P = 0.032$) (见表1)。

表 1 新鲜型和冻干型菌悬液在 5 个品牌 TSA 培养基上生长数量

品牌	测量次数	新鲜型		冻干型	
		(菌落数 ± 标准差) /CFU	变异系数 /%	(菌落数 ± 标准差) /CFU	变异系数 /%
A	10	113 ± 17	15.0	65 ± 4	6.2
B	10	119 ± 21	17.8	70 ± 9	12.9
C	10	104 ± 16	15.4	58 ± 8	13.8
D	10	107 ± 31	29.0	61 ± 8	13.1
E	10	117 ± 16	13.7	75 ± 4	5.3

2.2.2 新鲜型和冻干型菌悬液在不同品牌TSA培养基上菌落平均直径

新鲜型和冻干型菌悬液在5个品牌TSA培养基上的菌落平均直径均存在极显著性差异 ($P < 0.001$)。其中,冻干型和新鲜型菌悬液在品牌C、D培养基上的菌落平均直径极显著大于品牌B和E ($P < 0.001$);冻干型菌悬液在品牌A培养基上的菌落平均直径也极显著大于品牌B和E ($P < 0.001$)。

将冻干型与新鲜型菌悬液在TSA培养基上的菌

落平均直径进行对比发现,在品牌C ($P=0.015$)和D ($P=0.012$)的TSA培养基上,冻干型菌悬液的菌落平均直径显著大于新鲜型菌悬液;在品牌A ($P < 0.001$)和B ($P=0.007$)的TSA培养基上,冻干型菌悬液的菌落平均直径极显著性大于新鲜型菌悬液(表2)。冻干型与新鲜型菌悬液在5个品牌TSA培养基上菌落平均直径的变异系数未见显著性差异 ($P=0.697$)。菌落平均直径大小与生长数量在不同品牌培养基间(表2)未发现相关关系。

表2 新鲜型和冻干型菌悬液在5个品牌TSA培养基上菌落平均直径

品牌	测量次数	新鲜型		冻干型	
		(菌落直径 \pm 标准差) /mm	变异系数 /%	(菌落直径 \pm 标准差) /mm	变异系数 /%
A	10	2.83 \pm 0.30	10.6	3.57 \pm 0.38	10.6
B	10	2.35 \pm 0.29	12.3	2.88 \pm 0.46	16.0
C	10	3.22 \pm 0.44	13.7	3.80 \pm 0.51	13.4
D	10	3.22 \pm 0.49	15.2	3.85 \pm 0.53	13.8
E	10	2.66 \pm 0.41	15.4	2.65 \pm 0.26	9.8

2.2.3 新鲜型和冻干型菌悬液在不同品牌TSA培养基上肉眼可见菌落出现时间

对2种菌悬液在5个品牌TSA培养基上肉眼可见菌落出现时间进行对比发现,冻干型菌悬液在TSA培养基上的肉眼可见菌落出现时间显著短于新鲜型菌悬液 ($P=0.047$)。冻干型菌悬液在5个品牌TSA

培养基上的肉眼可见菌落出现时间进行对比发现,品牌B显著性短于品牌A、D、E ($P < 0.05$);新鲜型菌悬液在5个品牌TSA培养基上的肉眼可见菌落出现时间进行对比发现,品牌A、B、E显著性短于品牌C和D ($P < 0.05$)。见表3。

表3 新鲜型和冻干型菌悬液在5个品牌TSA培养基上肉眼可见菌落出现时间

品牌	测量次数	新鲜型 /h	冻干型 /h
A	10	11.20 \pm 0.42	11.10 \pm 0.39
B	10	11.20 \pm 0.42	10.65 \pm 0.58
C	10	12.00 \pm 0.00	11.00 \pm 0.53
D	10	12.20 \pm 0.42	11.15 \pm 0.34
E	10	11.20 \pm 0.42	11.05 \pm 0.16

3 讨论

3.1 冻干型菌悬液与新鲜型菌悬液评价TSA培养基的差异

本研究对比了新鲜型和冻干型铜绿假单胞菌CMCC(B)10104菌悬液在5个品牌TSA培养基上的生长数量、菌落平均直径和肉眼可见菌落出现时间之间的差异,结果显示,2种菌悬液在不同品牌培养基上菌落平均直径和肉眼可见菌落出现时间均存在显著性差异,冻干型菌悬液在不同品牌TSA培养基上的生长数量呈现显著性差异。冻干型菌悬液在不同的TSA培养基上,呈现了更多的差异。我们认为,这主要由于冻干型菌种在生产过程中所受冷冻伤害有关。冷冻处理后的细菌复溶后以正常未损伤菌、损伤菌、死亡菌3种存在形式,活力上不均一。损伤菌在一定条件下可以修复^[9-14],在本研究情况下,修复情况随不同TSA培养基而异。而新鲜菌悬液则以未损伤的营养体为主,活力好而且均一。在实际检验工作中,待测样品中残留的微生物受药品本身抑菌性^[15]、水分活度^[16]及加工过程等影响,显然损伤菌的比例更大。作为一种菌种损伤模型,冻干型菌悬液更接近于微生物在待测样品的存活状态,更能灵敏识别培养基营养质量的差异,为培养基质量的对比和验收提供了良好的即用型工具。

本研究显示,铜绿假单胞菌CMCC(B)10104冻干型菌悬液在5个品牌TSA培养基上的菌落生长数量存在显著性差异,而新鲜型菌悬液的菌落生长数量未见显著性差异,这一结果与有关报道^[8]一致。虽然不同品牌TSA培养基生产过程中遵循了统一的配方,由于不同厂家培养基原料、生产工艺等存在一定差异,导致不同品牌TSA培养基在质量上参差不齐^[17-18]。两项研究的数据均显示,作为典型损伤模型的冻干型菌悬液在不同培养基上形成的菌落数量可灵敏地识别这一差异,该分析结果可为实验室检验、环境监测等活动筛选出更为可靠、灵敏的培养基。

本研究显示,冻干型菌悬液在不同品牌TSA培养基上形成菌落数量的变异系数显著低于新鲜型菌悬液。众所周知,微生物在培养过程中会形成联体、细小团块等,简单菌悬液制备流程很难使菌体在溶液中均匀分布,如果直接涂布计数会造成重复测定样品间的较大变异。而冻干型产品生产企业

在生产过程中会进行针对处理(如使用胰酶消化等),减少联体、团块的数量,使菌体在溶液中更为均匀的分布,进而使得涂布计数菌落数量的变异系数最大程度减小^[19]。冻干型菌悬液在计数结果上具有良好重复性,为培养基的验收提供了更为可靠的技术工具。

本研究数据显示,冻干型菌悬液在TSA培养基上的菌落直径大于新鲜型菌悬液,肉眼可见菌落出现时间也短于新鲜型菌悬液,这可能与冻干型菌悬液中含有微量的冻干保护剂^[20-21],以及冻干型菌悬液使用了厂家提供的复溶液^[22]有关。这些营养或保护成分在一定程度上弥补了菌种在冻干过程中所受的损伤,为菌种在TSA培养基上的生长创造了良好条件。

3.2 培养基适用性检查的注意事项

做培养基适用性检查时,药典规定在菌落大小、形态特征方面,待测培养基应与对照培养基间无明显差异^[1]。菌落形态、大小是一个不易量化的观测指标。本研究采用Interscience Scan4000菌落计数仪直接测量并计算菌落的平均直径,直接实现了菌落大小的量化比较,并识别出不同品牌培养基间的确存在一定的差异,进一步验证了相关研究^[23]。而使用Read Bio-400微生物自动培养及监控分析系统,可顺利实现不同培养基上菌落出现时间的对比分析,进一步识别出不同培养基间的确存在质量差异,印证了菌落数量差异的结果。

研究显示,菌种生长数量较少的TSA培养基(C和D)上,肉眼可见菌落出现时间相对更为滞后,这进一步验证了这2个品牌培养基的质量与其他培养基相比,不利于菌种的修复或生长;然而在这2个品牌的培养基上,菌落平均直径相对较大(表1~3),这可能与菌落较少时,单个菌落获得的营养更为丰富、菌落间相互抑制作用较弱有关。这一结果提示,在进行培养基质量判别时,应首先关注菌落数量和肉眼可见菌落出现时间,这两项指标无显著差异时,进一步对比菌落的大小。

总之,冻干型定量微生物产品使实验操作更为便捷,所得结果可靠,利于筛选出对损伤菌促生长能力强的培养基,继而提升环境、药品中有害微生物的检出水平。微生物实验室可以使用操作简单的冻干型菌悬液对计数培养基适用性和计数方法进行验证。

参考文献：

- [1] 中华人民共和国药典：四部[S]. 2020：指导原则9203.
- [2] 李趣嫦，张帆，李文靖，等. 商业定量菌株用于药品微生物计数法建立的可行性探讨[J]. 药物分析杂志，2020，40（11）：2093-2097.
- [3] 刘婷婷，牛萌萌，张捷. 定量标准菌株在药品微生物限度检查方法适用性试验中的应用[J]. 中国药师，2020（5）：965-967.
- [4] 解慧. 金黄色葡萄球菌定量质控菌株的制备及其在检验工作中的应用[J]. 天津药学，2018（5）：7-10.
- [5] Morgan CA, Herman N, White PA, et al. Preservation of Micro-organisms by Drying: A Review[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66（2）：183-193.
- [6] Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, et al. Survival Curves for Microbial Species Stored by Freeze-drying[J]. Cryobiology, 2006, 52（1）：27-32.
- [7] 宋金慧，吕加平，王知非，等. 离心条件对冻干菌株存活率影响的研究[J]. 食品工业科技，2009，30（11）：82-84.
- [8] 王似锦，周发友，刘鹏，等. 2种即用型工作菌株在琼脂培养基上的生长情况研究[J]. 中国药品标准，2020，21（5）：385-389.
- [9] 丁宇，陈伟鑫，余玮. 冻伤大肠杆菌的修复方法探讨[J]. 中国卫生检验杂志，2006（1）：104-105.
- [10] 闫李侠，居军，陈保文，等. 培养温度对冻干分枝杆菌菌种复苏的影响[J]. 中国防痨杂志，2008（3）：248-250.
- [11] Carvalho AS, Silva J, Ho P, et al. Effect of Various Growth Media upon Survival during Storage of Freeze-dried Enterococcus Faecalis and Enterococcus Durans[J]. J Appl Microbiol, 2003, 94（6）：947-52.
- [12] Karolenko CE, Bhusal A, Gautam D, et al. Selenite Cystine Agar for Enumeration of Inoculated Salmonella Serovars Recovered from Stressful Conditions during Antimicrobial Validation Studies[J]. Microorganisms, 2020, 8（3）：338.
- [13] 张勇，刘衡川，周海涛，等. 冷冻损伤大肠菌群在乳糖胆盐发酵培养基生长状况[J]. 中国热带医学，2009，9（6）：999-1001.
- [14] 曾庆梅，张冬冬，韩抒，等. 热损伤肠炎沙门氏菌的修复方法研究[J]. 食品科学，2009，30（23）：233-236.
- [15] 马仕洪，刘鹏，杨利红，等. 药品微生物限度检查方法适用性试验中加菌方式的实验研究[J]. 药物分析杂志，2018，38（5）：877-882.
- [16] 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.
- [17] 武永秀，马仕洪，杨美琴，等. 人参土芽孢杆菌用于胰酪大豆琼脂培养基的质量控制研究[J]. 中国药事，2019，33（2）：166-171.
- [18] 解慧，路立京，曹晓云. 市售《中国药典》2015年版非无菌产品微生物限度检查用培养基质量评价[J]. 天津药学，2016，28（5）：18-22.
- [19] 赵红阳. 铜绿假单胞菌适用性试验菌株及其制备方法：浙江省，CN109971672A[P]. 2019-07-05.
- [20] 李丽，赵彭年，朱希坤. 冻干保护剂对假单胞菌菌粉存活率的影响[J]. 生物技术通报，2017（9）：231-234.
- [21] 徐丽萍. 嗜酸乳杆菌冻干菌粉保护剂选择的研究[J]. 食品工业科技，2007（5）：119-122.
- [22] 董姣姣. 一种冻存菌株的复溶液及其制备方法和应用：北京市，CN113481101A[P]. 2021-10-08.
- [23] 谢文，赵宏大，范文平. 药品检验用营养琼脂培养基的质量评价[J]. 中国药房，2014（1）：57-60.

（收稿日期 2022年5月11日 编辑 郑丽娥）