

## 生物检定 · 代谢分析

## 制药用水及受控环境中寡营养微生物的生物负载监测\*

范一灵<sup>1,2</sup>, 李琼琼<sup>2</sup>, 王培恩<sup>2</sup>, 杨美成<sup>1,3\*\*</sup>

(1. 中国医药工业研究总院, 上海 201203; 2. 国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 上海市创新生物制品质量检验检测中心, 上海市食品药品检验研究院, 上海 201203; 3. 上海市食品药品包装材料测试所, 上海 201203)

**摘要** **目的:** 筛选适用于制药环境中寡营养微生物的监测方法, 了解制药用水及洁净环境等寡营养条件下的生物负载及微生物特征。**方法:** 通过比较 R<sub>2</sub>A 和 TSA 培养基对实验室纯水中微生物在不同温度、培养基及培养时间的计数结果比较, 优化寡营养条件下微生物的培养条件和检测方法。以传统方法与寡营养检测方法同时开展制药生产环境中寡营养微生物的监测, 结合 16s rDNA 测序和 MALDI-TOF MS 等技术, 对分离的微生物开展多相微生物鉴定及分析。**结果:** 菌落计数方法、培养基种类和培养时间在微生物计数中有显著性影响, 采用寡营养 R<sub>2</sub>A 培养基分离环境微生物的效果优于 TSA 培养基。上述 2 种培养基的微生物分离谱差异较大, 在 R<sub>2</sub>A 培养基中革兰阴性菌的分离率可达 37.0%, 在 TSA 培养基中革兰阴性菌的分离率仅为 14.0%。此外, 初次分离于 R<sub>2</sub>A 培养基的多株条件致病微生物在 TSA 培养基中生长缓慢, 在传统监测方案中易被漏检。**结论:** 随着制药工艺的发展, 以革兰阳性球菌为主的人源性微生物污染比例将逐步下降, 适时选用寡营养微生物监测方法作为传统技术的补充, 有助于在早期发现生产环境中潜在的不可接受微生物污染风险。

**关键词:** 寡营养微生物; 制药用水; 受控环境; 生物负载; 不可接受微生物

中图分类号: R 917      文献标识码: A      文章编号: 0254-1793(2024)11-1899-10  
doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0357

## Monitoring the bioburden of oligotrophs in pharmaceutical water systems and controlled environments\*

FAN Yi-ling<sup>1,2</sup>, LI Qiong-qiong<sup>2</sup>, WANG Pei-en<sup>2</sup>, YANG Mei-cheng<sup>1,3\*\*</sup>

(1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China; 2. NMPA Key Laboratory for Testing Technology of Pharmaceutical Microbiology, Shanghai Quality Inspection and Testing Center for Innovative Biological Products, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China; 3. Shanghai Food and Drug Packaging Material Control Center, Shanghai 201203, China)

**Abstract** **Objective:** To screen the suitable monitoring method applicable to oligotrophs and review the bioburden and microbial species of oligotrophic environments in pharmaceutical water systems and cleanrooms. **Methods:** The culture conditions and detection methods suitable for microorganisms under oligotrophic conditions were optimized by comparing the counting results of microorganisms in laboratory pure water with R<sub>2</sub>A and TSA media at different temperatures, media, and incubation times. In addition, monitoring of oligotrophs in pharmaceutical

\* 上海市药品监督管理局监管科学研究项目(ZD-2023-06); 中国医药工业研究总院研究生创新基金项目(YJS2022009)

\*\* 通信作者 Tel: (021)38839900; E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

第一作者 Tel: (021)38839900; E-mail: tcfyl@163.com

environments using both the traditional and oligotrophic assays were conducted, combining with the techniques of 16s rDNA sequencing and MALDI – TOF MS for multiphase microbial identification and analysis of the isolated microorganisms under oligotrophic conditions. **Results:** The colony counting methods, the type of culture media, and the incubation intervals significantly affected microbial enumeration. The isolation method using oligotrophic medium R<sub>2</sub>A was more effective than the TSA medium in this study. The profiles of microorganisms isolated from the R<sub>2</sub>A and TSA media were unique. The isolation rate of Gram – negative bacteria in the R<sub>2</sub>A medium reached 37.0%, however, that of Gram – negative bacteria in the TSA medium was only 14.0%. In addition, several strains of potential pathogens initially isolated from the R<sub>2</sub>A medium grew slowly in the TSA medium and were easily missed by the traditional monitoring method. **Conclusion:** With the development of the pharmaceutical industry, the contamination proportion of human – associated Gram – positive cocci might gradually decrease, the oligotrophic culture method as a powerful supplement to traditional monitoring techniques can help to detect potential objectionable microorganism contamination risks at an early stage.

**Keywords:** oligotrophs; pharmaceutical water; controlled environment; bioburden; objectionable microorganism

寡营养微生物(oligotrophs)是一类可存活于有机物含量极低环境中(含碳量 $1 \sim 15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),并保持一定生长速率的微生物<sup>[1]</sup>,主要由非发酵革兰阴性菌组成,广泛存在于天然水体、空气和土壤等自然环境样本中<sup>[2]</sup>。寡营养微生物自身耗氧量低、营养需求少,极易在药品生产环境及其水系统中长期存活和生长<sup>[3]</sup>。寡营养微生物一般都具有较强的环境耐受性,可产生生物被膜、生物毒素和耐受性等自我保护机制,同时携带多种抗生素耐药性<sup>[4-5]</sup>,抵抗一定浓度的消毒剂<sup>[6-7]</sup>。此外,该类微生物可共享环境种群的生物学特性,通过质粒在微生物群落间传播耐药性和抗逆性<sup>[8-9]</sup>。在营养条件的选择压力下,寡营养微生物往往处于活的不可培养状态,很难通过常规手段培养分离<sup>[10]</sup>。已知的寡营养微生物主要为不动杆菌属(*Acinetobacter* spp.)、甲基杆菌属(*Methylobacterium* spp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia* spp.)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* spp.)、气单胞菌属(*Aeromonas* spp.)、军团菌属(*Legionella* spp.)和分枝杆菌属(*Mycobacterium* spp.)等微生物<sup>[11]</sup>。其中,不少寡养微生物属于条件致病菌,每年可引起上万人感染<sup>[12-13]</sup>。寡营养微生物可随药品原辅料和生产工艺最终进入终产品中,导致药品和医院制剂的污染<sup>[14-15]</sup>,是医药产品中内毒素的主要来源之一<sup>[9]</sup>,易感人群、免疫抑制和免疫缺陷患者的安全带来巨大影响。

制药生产过程中生物负载的监控方式主要以胰

酪大豆胨液体培养基(Soybean – Casein Digest Agar, SCDA)或沙氏葡萄糖琼脂(Sabouraud's Dextrose Agar, SDA)等富营养培养基为主,适合培养嗜中温微生物<sup>[10, 16-17]</sup>。该类微生物以人源革兰阳性球菌为主要污染源<sup>[18-19]</sup>。因在自然环境中寡营养微生物可能处于活的不可培养状态(Viable but non – culturable, VBNC),且生长缓慢,在首次复苏培养时无法迅速适应富营养的培养条件,容易被其他微生物群落掩盖<sup>[20-21]</sup>,难以在制药行业日常监测中快速获得可培养和可观察的菌落<sup>[22]</sup>。因此,传统制药环境监测中使用的富营养培养方法可能并不适用于寡营养微生物种群的监测。

随着技术进步,以基因治疗产品等为代表的新兴生物制品已全面步入了全封闭生产(隔离系统)和自动化生产(连续制造)的新阶段。在核心生产工艺中,操作人员直接接触产品的概率持续降低,预期将显著减少人源性微生物的污染。药品生产链中污染微生物的种群必然随着生产工艺进步而变化。已有研究显示,在临床样本和无菌药物生产车间中大量分离到了寡营养微生物种群<sup>[15-23]</sup>。制药洁净环境中由物料、空气和制药用水等为主要污染源的寡营养微生物极有可能成为未来药品污染微生物的重要因素之一。探索寡营养微生物的有效监测方法已迫在眉睫。常见的寡营养培养基主要有R<sub>2</sub>A培养基和1/10或其他低浓度的SCDA等培养基<sup>[24-25]</sup>。为有效分离水系统寡营养环境引入的微生物污染,提高微生物检出率,国际主流药典已普遍选用R<sub>2</sub>A培养

基作为制药用水微生物监测的首选培养基<sup>[26-27]</sup>。

本研究通过筛选适宜的寡营养微生物培养方法,监测制药企业及药品检验实验室典型环境(制药用水、洁净空气和洁净表面等),解决传统生物负载监测技术可能漏检寡营养微生物的问题。依托微生物多相鉴定技术,分析真实制药环境中微生物的种类与群落分布,丰富我们对制药行业潜在的风险微生物种类的认识,为企业建立更为全面的环境微生物监测方案,满足企业对不可接受微生物的风险评估需求。

## 1 实验材料、仪器与试剂

### 1.1 实验材料

实验中选用的 R<sub>2</sub>A 和 TSA 培养基均采购自北京陆桥技术有限责任公司,按厂家说明书制备。表面菌采样皿规格为 55 mm,其余皿规格为 90 mm。试验用纯化水样本来自上海市食品药品检验研究院微生物实验室管道纯化水。环境样本来自国内某生物制药公司细胞生产车间。

### 1.2 实验仪器

试验所用主要仪器为 Biotyper 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS,布鲁克公司);Veritii PCR 扩增仪(赛默飞公司);QuantityOne 紫外凝胶成像仪(伯乐公司)。数据统计软件选用 OriginPro 2018。

### 1.3 实验试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒采购自北京天根生

化科技公司。细菌核酸扩增及测序上游引物 27F: 5'-AGA GTTTGATCCTGGCTCAG-3',下游引物 1492R: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。DNA 引物合成与测序服务由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。

## 2 实验方法

### 2.1 药品检测实验室纯水系统微生物监测

以直接接种法和薄膜过滤法分别监测药品检测实验室内 10 个管道纯水使用点。每个使用点的纯化水采样量不少于 100 mL。取 4 份纯化水各 1 mL 直接接种于 TSA 培养基中,于 20~25 °C 和 30~35 °C 各培养 2 个平皿;另取 4 份纯化水各 1 mL 接种于 R<sub>2</sub>A 培养基中,于 20~25 °C 和 30~35 °C 培养 2 个平皿。同法以薄膜过滤法替代直接接种法接种 2 种培养基,薄膜过滤法(滤膜孔径 ≥ 0.45 μm,直径约为 50 mm)过滤纯化水量为 10 mL,并置 2 个温度培养。记录上述培养物在培养第 3、5 和 7 d 时的需氧菌总数计数结果,分别计算不同条件下的菌落数平均值(CFU · mL<sup>-1</sup>)。分析 2 种培养基在不同培养时间、培养温度和接种方法对纯化水中需氧菌总数计数结果的影响。

### 2.2 制药企业环境微生物监测

对制药业洁净室的采样按 2020 年版《中华人民共和国药典》通则 9205 要求执行,生产洁净车间采样布点示意图见图 1。

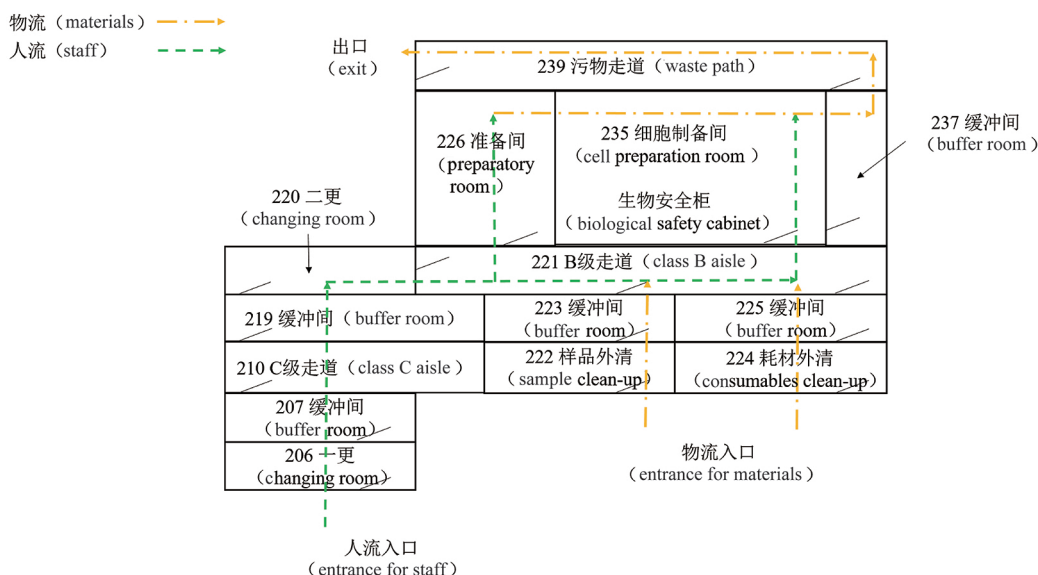


图 1 生产洁净车间微生物采样布点示意图

Fig. 1 Schematic diagram of microbial sampling points in production cleanrooms

采用 R<sub>2</sub>A 和 TSA 培养基分别收集生产车间洁净室的沉降菌、浮游菌、设备与操作人员的表面菌,采样信息见表 1。其中,以 TSA 培养基监测的采样点取

2 个样品,以 R<sub>2</sub>A 培养基监测的采样点取 1 个样品,墙面均仅取 1 个样品。采样后置 30 ~ 35 °C 培养 7 d,统计需氧菌总数计数结果。

表 1 生产洁净车间微生物采样点信息汇总

Tab. 1 Summary of microbiological sampling points in production cleanrooms

房间 (room)	功能 (function)	洁净度 (clean- iness)	TSA 培养基采样点数 (number of sampling points using TSA media)			R <sub>2</sub> A 培养基采样点数 (number of sampling points using R <sub>2</sub> A media)		
			AB <sup>a</sup>	ST	SF	AB	ST	SF
206	一更(1 <sup>st</sup> changing room)	D	2	2	-	1	-	-
207	缓冲间(buffer room)	C	2	2	门把手(door handle):2	1	1	内侧把手(inside door handle):1
210	C 级走道(class C aisle)	C	2	2	墙面(wall):2	1	1	墙面(wall):1
219	缓冲间(buffer room)	C	- <sup>b</sup>	-	门把手(door handle):2	-	-	内侧把手(inside door handle):1
220	二更(2 <sup>nd</sup> changing room)	B	-	-	门把手(door handle):2 墙面(wall):2 台面(desktop):1	-	-	内侧把手(inside door handle):1 墙面(wall):1
226	准备间(preparatory room)	B	-	-	门把手(door handle):1 墙面(wall):2 冰箱(refrigerator):1 台面(desktop):1	-	-	冰箱(refrigerator):1 台面(desktop):1
221	B 级走道(class B aisle)	B	-	1	门把手(door handle):2 墙面(wall):2	-	1	内侧把手(inside door handle):1 墙面(wall):1
223	缓冲(buffer room)	B	-	-	门把手(door handle):2 墙面(wall):2	-	-	-
225	缓冲(buffer room)	B	-	-	门把手(door handle):2 墙面(wall):2	-	-	-
235	细胞制备间(cell preparation room)	B	-	1	门把手(door handle):2 墙面(wall):2 台面(desktop):1 设备表面(equipment surface):7	-	1	内侧把手(inside door handle):2 墙面(wall):2 台面(desktop):1 设备表面(equipment surface):2
235	生物安全柜(biological safety cabinet)	A	2	2	设备表面(equipment surface):4	2	2	设备表面(equipment surface):2
237	缓冲间(buffer room)	B	-	-	门把手(door handle):2 墙面(wall):2	-	-	-
239	污物走道(waste path)	C	1	-	墙面(wall):2	1	-	墙面(wall):1
	采样人员(sampler)		-	-	手套(gloves):2	-	-	手套(gloves):2
	总计(total)		9	10	52	6	6	21

注(note) a. AB:浮游菌(airborne microbes);ST:沉降菌(settling microbes);SF:表面菌(surface microbes);b. 未设置监测点(no monitoring points set)

### 2.3 微生物的鉴定

挑取每个监测平板中表形形态不同的微生物,分别划线接种至 R<sub>2</sub>A 和 TSA 培养基,置 30 ~ 35 °C 培养纯化。采用 MALDI - TOF MS 技术对分离的微生物进行鉴定,对无法获得准确鉴定结果的微生物(置信度小于 2.0),采用 16S rDNA 测序技术鉴定。

MALDI - TOF MS 鉴定方法如下<sup>[28]</sup>:采用原位甲酸提取法,将待测微生物均匀涂抹于检测靶板上,自然干燥后加入 70% 甲酸溶液 1 μL,干燥后加入 α - 氰基 - 4 - 羟基肉桂酸(HCCA)基质溶液 1 μL,

充分晾干后上机检测,确定微生物鉴定结果。16S rDNA 测序鉴定方法如下<sup>[29]</sup>:将待测微生物用 500 μL 生理盐水分散,按细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取核酸,置 100 μL TE 缓冲液 - 20 °C 保存。PCR 反应体系:DNA 模板 2 μL,rTag DNA 聚合酶 1U,1 × PCR 缓冲液,4 种 dNTP 各 200 μmol · L<sup>-1</sup>,上下游引物各 200 pmol · L<sup>-1</sup>,加纯化水至 50 μL。PCR 反应条件:95 °C 变性 1 min;95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min,产物置 - 20 °C 保存、测序。测序数据拼接后与

GenBank 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 的核酸信息比对, 确定菌株鉴定结果。

### 3 试验结果

#### 3.1 纯化水系统微生物监测

**3.1.1 纯化水系统的微生物计数** 采用单因素方差分析方法统计药品检测实验室 10 个纯化水点位的需氧菌总数计数结果(表 2)。试验选取的 3 个主要参数(计数方法、培养基种类和培养时间)显著影

响水系统需氧菌总数计数结果( $P < 0.01$ )。将每个监测点的菌落计数结果按计数方法(直接接种法与薄膜过滤法)、培养基种类( $R_2A$  培养基和 TSA 培养基)、培养时间(3、5 和 7 d)和培养温度(20 ~ 25 °C 和 30 ~ 35 °C)进行分类汇总, 采用 Origin 3D 条状图功能绘图(图 2), 可更直观地确定开展纯化水寡营养微生物检查的关键条件, 即采用  $R_2A$  培养基直接倾注法处理, 置 30 ~ 35 °C 培养不少于 7 d。

表 2 纯化水系统寡营养微生物监测数据的单因素方差分析

Tab. 2 One-way ANOVA results of oligotrophic microbial monitoring data in purified water systems

因素 (factor)	自由度 (degree of freedom)	平方和 (sum of squares)	均方 (mean variance)	F	P
计数方法(counting method)	1	4 983.325	4 983.325	95.192	0.000
培养基种类(media)	1	13 450.756	13 450.756	256.937	0.000
培养时间(time)	2	5 383.559	2 691.780	51.419	0.000
计数方法 × 培养基种类(counting method × media)	1	6 463.211	6 463.211	123.461	0.000
计数方法 × 培养时间(counting method × time)	2	3 245.377	1 622.689	30.997	0.000
培养基种类 × 培养时间(media × time)	2	4 592.607	2 296.304	43.864	0.000
计数方法 × 培养基种类 × 培养时间(counting method × media × time)	2	3 274.251	1 637.125	31.273	0.000
模型(modelling)	11	32 915.269	2 992.297	57.159	0.000
误差(error)	348	18 217.909	52.350	0.000	0.000
修正整体(statistical modification)	359	51 133.178	0.000	0.000	0.000

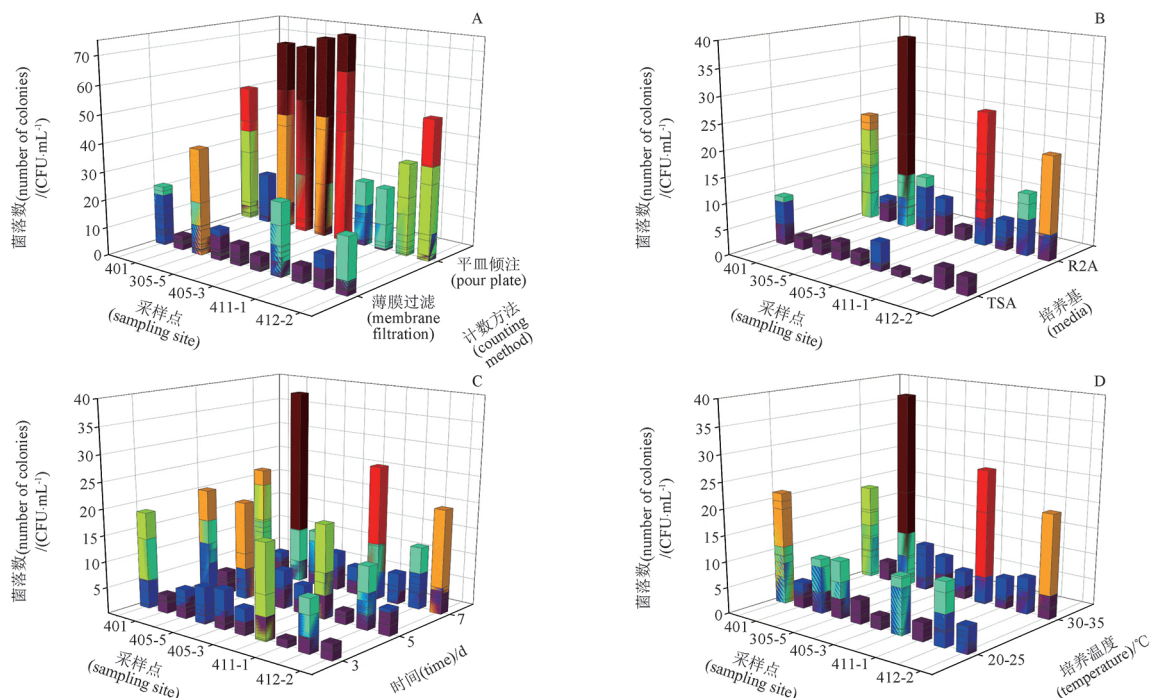
**3.1.2 纯化水系统的微生物鉴定** 在 10 个纯化水采样点中, 从  $R_2A$  和 TSA 培养基共分离并鉴定出 68 株典型微生物。其中,  $R_2A$  培养基分离得到菌种数量占比为 42.6% (29/68), TSA 培养基分离得到菌株数量占比为 57.4% (39/68)。按菌株初次分离的培养基分类鉴定结果汇总见表 3, 不同培养基监测到的微生物种群有较大差异。本次监测中在 TSA 和  $R_2A$  培养基中共同分离出了 7 种微生物, 其中 *Ralstonia pickettii* 是报道对水基质产品可能具备潜在危害的不可接受微生物。在  $R_2A$  培养基中分离出 3 种在 TSA 培养基上不易分离或不易生长的条件致病菌株, 即 *Bacillus altitudinis*、*Brevibacillus agri* 和 *Brevibacillus choshinensis*。这 3 种微生物均可产生芽孢, 能抵抗部分高温、消毒等不利条件。当然, 在 TSA 培养基中也分离出独特的微生物种群, 包括葡萄球菌属微生物。TSA 作为常用监测培养基可检测到更多的人源性污染微生物,  $R_2A$  培养基作为监测寡营养体系的培养基, 可有效分离部分生长较慢的微生物。因此, 在水系统监测过程中, 可根据实际情况联合选用寡营养和富营养培养基, 以期更全

面、有效的监控水系统污染微生物种类和数量, 制定有针对性的消杀策略。

#### 3.2 制药环境寡营养微生物的监测

**3.2.1 制药环境寡营养微生物的计数** 对制药生产车间 13 个采样点位的 104 个监测数据进行统计分析。排除同一采样点 2 种培养基上均为零值的结果, 将非零值的监测数据列于表 4。其中,  $R_2A$  培养基的结果为皿计数值, TSA 培养基的结果为 2 个重复测试的平均值。采用  $R_2A$  和 TSA 培养基对企业洁净环境监测的结果均满足 2020 年版《中华人民共和国药典》四部通则 9205 对洁净环境的要求。以双样本 T 检验方法分析,  $R_2A$  和 TSA 培养基的计数结果虽然在统计上无显著性差异( $P > 0.05$ ), 但  $R_2A$  培养基的计数总平均值( $9.6 \text{ CFU} \cdot \text{皿}^{-1}$ ) 大于 TSA 培养基的计数结果( $3.8 \text{ CFU} \cdot \text{皿}^{-1}$ )。  $R_2A$  培养基菌落计数的结果略高于 TSA 培养基的计数结果。

**3.2.2 制药环境寡营养微生物的鉴定** 在制药环境各采样点中, 共分离出 105 种典型微生物。其中, 从  $R_2A$  培养基中共分离微生物 49 株(占比 46.7%),



A. 以直接接种法与薄膜过滤法为分类因素 (direct inoculation and membrane filtration as categorizing factors) B. 以 R<sub>2</sub>A 培养基和 TSA 培养基为分类因素 (R<sub>2</sub>A medium and TSA medium as categorizing factors) C. 以培养时间分别为 3、5 和 7 d 为分类因素 (incubation times of 3, 5 and 7 d as categorizing factors) D. 以培养温度分别为 20 ~ 25 °C 和 30 ~ 35 °C 为分类因素 (incubation temperatures of 20 - 25 °C and 30 - 35 °C as categorizing factors)

图 2 不同影响因素下纯化水系统生物负载计数结果

Fig. 2 Bioburden results for purified water systems under different influencing factors

表 3 TSA 与 R<sub>2</sub>A 培养基分离微生物汇总表

Tab. 3 Summary of microorganisms isolated by TSA and R<sub>2</sub>A media

初次分离的培养基 (medium for primary isolation)	菌株 (species)	特性 (character)
初次仅分离于 TSA 培养基 (separated from the TSA medium)	米兰农霉菌 ( <i>Agromyces mediolanus</i> )	真菌 (fungi)
	巨大芽孢杆菌 ( <i>Bacillus meqaterium</i> )	产芽孢 (spore producing)
	壁芽孢杆菌 ( <i>Bacillus muralis</i> )	产芽孢 (spore producing)
	短短芽孢杆菌 ( <i>Brevibacillus brevis</i> )	产芽孢 (spore producing)
	膝黄短小杆菌 ( <i>Curtobacterium luteum</i> )	条件致病菌 (opportunistic pathogen)
	埃吉类芽孢杆菌 ( <i>Paenibacillus elqii</i> )	/
	解葡聚糖类芽孢杆菌 ( <i>Paenibacillus glycanilyticus</i> )	/
	山羊葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus caprae</i> )	条件致病菌 (opportunistic pathogen)
	嗜麦芽窄食单胞菌 ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )	条件致病菌 (opportunistic pathogen)
	初次仅分离于 R <sub>2</sub> A 培养基 (separated from the R <sub>2</sub> A medium)	高地芽孢杆菌 ( <i>Bacillus altitudinis</i> )
土壤短芽孢杆菌 ( <i>Brevibacillus agri</i> )		产芽孢 (spore producing)
桥石短芽孢杆菌 ( <i>Brevibacillus choshinensis</i> )		产芽孢 (spore producing)
在 TSA 和 R <sub>2</sub> A 共同分离的菌株 (separated from the TSA and R <sub>2</sub> A media)	蜡样芽孢杆菌 ( <i>Bacillus cereus</i> )	产芽孢 (spore producing)
	海泥芽孢杆菌 ( <i>Bacillus oceanisediminis</i> )	产芽孢 (spore producing)
	简单芽孢杆菌 ( <i>Bacillus simplex</i> )	产芽孢 (spore producing)
	类短短芽孢杆菌 ( <i>Brevibacillus parabrevis</i> )	产芽孢 (spore producing)
	罗伊氏短芽孢杆菌 ( <i>Brevibacillus reuszeri</i> )	产芽孢 (spore producing)
	腐殖质类芽孢杆菌 ( <i>Paenibacillus humicus</i> )	/
	皮氏罗尔斯顿菌 ( <i>Ralstonia pickettii</i> )	条件致病菌 (opportunistic pathogen)

表 4 制药环境监测点 TSA 与 R<sub>2</sub>A 培养基的计数结果Tab. 4 Colony counts of TSA and R<sub>2</sub>A media at pharmaceutical environmental monitoring sites

房间号 (room)	监测项目 (monitoring item)	菌落计数(colony count)/(CFU · 皿 <sup>-1</sup> )(CFU per dish)	
		R <sub>2</sub> A 培养基(R <sub>2</sub> A medium)	TSA 培养基* (TSA medium)
206	沉降菌(settling microbe)	28	22
207	浮游菌(airborne microbe)	17	5
207	把手表面菌(surface microbe on door handles)	2	1
210	沉降菌(settling microbe)	6	2
210	浮游菌(airborne microbe)	8	8
219	把手表面菌(surface microbe on door handles)	<1 <sup>#</sup>	1
220	墙面表面菌(surface microbe on walls)	<1	0.5
220	把手表面菌(surface microbe on door handles)	2	<1
221	沉降菌(settling microbe)	<1	0.5
221	浮游菌(airborne microbe)	1	0.5
224	沉降菌(settling microbe)	38	14.5
235	把手表面菌(surface microbe on door handles)	2	0.5
239	浮游菌(settling microbe)	1	1.5
239	墙面表面菌(surface microbe on walls)	38	<1
235	把手表面菌(surface microbe on door handles)	1	<1

注(note):表中数据排除了同一采样点2种培养基上均为零值的结果(the data in the table exclude results with zero values on both media at the same sampling point);\*. TSA培养基监测数据为2个重复的平均值(the monitoring data from TSA medium were averages of 2 replicates);#. 平皿培养基中无菌落生长(no colony growth was observed on the media)

从TSA培养基共分离微生物56株(占比53.3%)。对上述2种培养基分离的微生物进行鉴定(表5),按革兰染色结果分类,R<sub>2</sub>A培养基中革兰阴性菌的分离率为37.0%,革兰阳性菌的分离率为63.0%。而TSA培养基中革兰阴性菌的分离率仅为14.0%,革兰阳性菌的分离率高达86.0%。以“属”分类,从R<sub>2</sub>A培养基中分离率最高的前3种微生物为 *Micrococcus* spp.、*Bacillus* spp. 和 *Stenotrophomonas* spp., 占比分别为22.5%、14.3%和14.3%。从TSA培养基中分离率最高的前3种微生物为 *Staphylococcus* spp.、*Micrococcus* spp. 和 *Bacillus* spp., 占比分别为39.3%、19.6%和8.9%。其中, *Stenotrophomonas* spp. 在TSA培养基中分离率占比仅为1.8%。相反的,在TSA培养基中 *Staphylococcus* spp. 的分离率占比超过39.3%,而该微生物在R<sub>2</sub>A培养基中的分离率仅为12.2%。

R<sub>2</sub>A和TSA培养基在同一环境中对微生物种群的分离率存在明显差异,在R<sub>2</sub>A培养基上单一微生物种群占比明显低于TSA培养基(图3)。同时,微生物在R<sub>2</sub>A培养基的菌落明显小于TSA培养基,即R<sub>2</sub>A培养基中微生物的生长速度相对较慢,符合寡

营养微生物的生长特点。在充分的培养时间下(7d),R<sub>2</sub>A培养基上的微生物在形成独立菌落前,不易互相掩盖,有利于非优势种群的发现和分离。

TSA培养基适合于监测常见人源性污染微生物,主要为革兰阳性菌;R<sub>2</sub>A培养基更适合监测和分离环境中革兰阴性微生物,能提高洁净环境中寡养微生物的检出概率。寡养培养方法可作为常规环境监测方法的补充,更全面的揭示环境污染风险。

#### 4 讨论

生物负载监控是制药生产过程中的一项重要工作,其目的是确保在药品全生命周期中微生物污染保持在可接受水平,以满足法规和质量标准的要求。对具体产品及相应工艺的风险评估而言,工艺中的微生物种类和污染量同样重要。传统制药工艺中无法有效隔离人员操作的影响,人源性微生物是制药工业过程中引入外源性污染的主要来源。因此,采用TSA培养基为主的监控技术可有效反映传统工艺中微生物的总体污染情况<sup>[29-30]</sup>。R<sub>2</sub>A属于寡营养培养基,有助于抑制常见微生物,尤其是革兰阳性球菌的生长速度,使得其他寡营养微生物不易被掩盖。且在R<sub>2</sub>A培养基上微生物更容易产生

表 5 制药环境 R<sub>2</sub>A 和 TSA 培养基中典型微生物的分离率Tab. 5 Isolation rates of typical microorganisms in R<sub>2</sub>A and TSA media in pharmaceutical environment

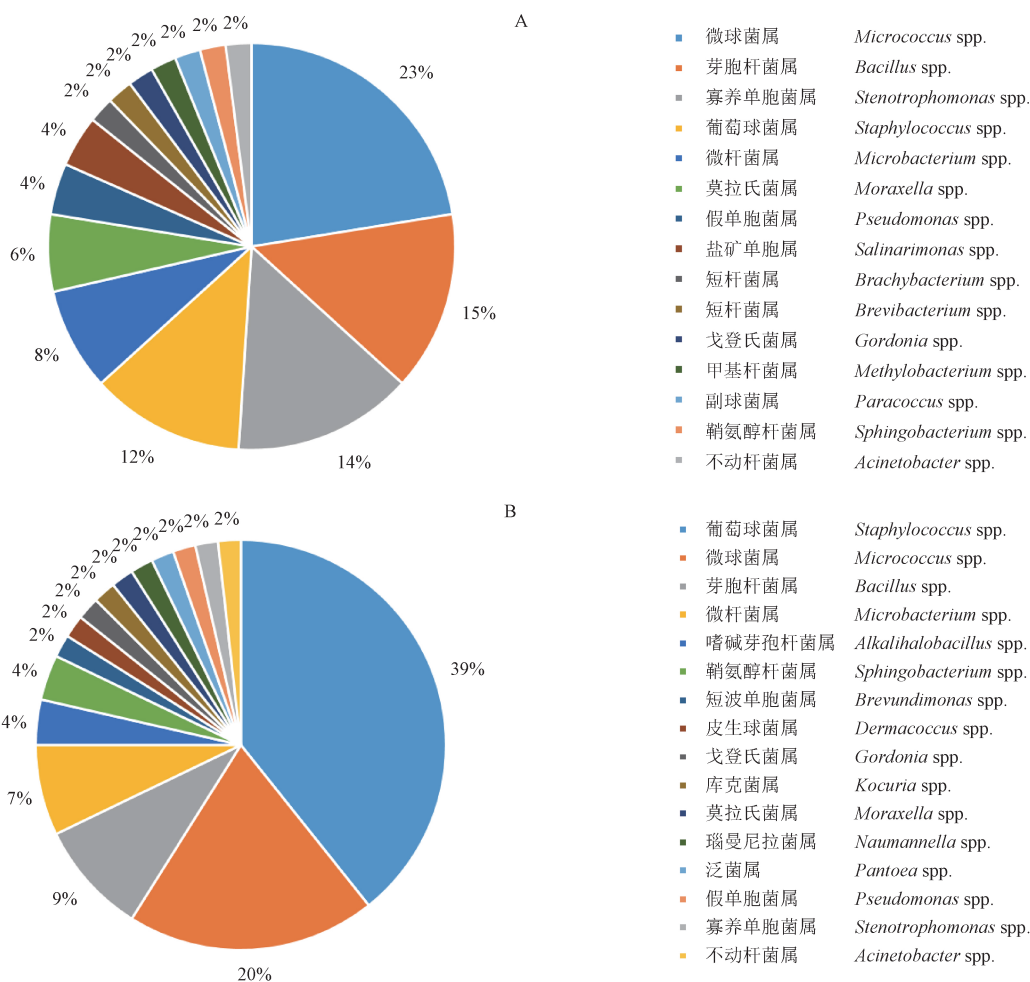
序号 (No.)	微生物种类 (type of microbes)	革兰染色 (Gram stain)	分离率(isolation rate)/%	
			R <sub>2</sub> A 培养基(R <sub>2</sub> A medium)	TSA 培养基(TSA medium)
1	微球菌属( <i>Micrococcus</i> spp.)	G+	22.5	19.6
2	芽孢杆菌属( <i>Bacillus</i> spp.)	G+	14.3	8.9
3	寡养单胞菌( <i>Stenotrophomonas</i> spp.)	G-	14.3	1.8
4	葡萄球菌属( <i>Staphylococcus</i> spp.)	G+	12.2	39.3
5	微小杆菌属某些种( <i>Microbacterium</i> spp.)	G+	8.2	7.1
6	莫拉菌属某些种( <i>Moraxella</i> spp.)	G-	6.1	1.8
7	假单胞菌属( <i>Pseudomonas</i> spp.)	G-	4.1	1.8
8	分枝盐场单胞菌属( <i>Salinarimonas</i> spp.)	G-	4.1	0.0
9	短杆菌属( <i>Brachybacterium</i> spp.)	G+	2.0	0.0
10	短杆菌属某些种( <i>Brevibacterium</i> spp.)	G+	2.0	0.0
11	戈登氏菌属( <i>Gordonia</i> spp.)	G+	2.0	1.8
12	甲基杆菌属( <i>Methylobacterium</i> spp.)	G-	2.0	0.0
13	副球菌属( <i>Paracoccus</i> spp.)	G-	2.0	0.0
14	鞘氨醇杆菌属( <i>Sphingobacterium</i> spp.)	G-	0.0	3.6
15	不动杆菌属( <i>Acinetobacter</i> spp.)	G-	0.0	1.8
16	嗜碱杆菌属( <i>Alkalihalobacillus</i> spp.)	G+	0.0	3.6
17	布鲁氏菌属( <i>Brevundimonas</i> spp.)	G-	0.0	1.8
18	皮肤球菌属( <i>Dermacoccus</i> spp.)	G+	0.0	1.8
19	库克氏菌属( <i>Kocuria</i> spp.)	G+	0.0	1.8
20	瑙曼氏菌属( <i>Naumannella</i> spp.)	G+	0.0	1.8
21	泛菌属某些种( <i>Pantoea</i> spp.)	G-	0.0	1.8

色素,便于在菌落形成初期的识别。各国药典已规定在制药用水的监测中使用寡营养培养基<sup>[26]</sup>。尝试使用 TSB 和 R<sub>2</sub>B 液体培养基分析寡营养微生物(*Ralstonia pickettii*、*Paenibacillus lautus* 等)的生长情况,初步结果显示,寡营养液体培养基 R<sub>2</sub>B 中微生物的生长速率显著低于富营养培养基 TSB,培养 60 h 后 R<sub>2</sub>B 培养基中微生物的终浓度约为 TSB 培养基的 30%~70%。

随着制药工艺的不断进步,尤其在细胞治疗产品和基因治疗产品等新兴生物制药工艺中已广泛应用隔离系统和密闭式生产工艺,极大的避免了人员与生产过程的直接接触。可以预测随着自动化与隔离程度的不断提高,人源性微生物污染比例将显著下降。而自然界中广泛存在的寡营养微生物,如洋葱伯克霍尔德菌群(*Burkholderia cepacia* complex)、罗尔斯通菌属(*Ralstonia* spp.)、寡氧单胞菌属(*Stenotrophomonas* spp.)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* spp.)、粘质沙雷菌(*Serratia marcescens*)、肺

炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumonia*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、不动杆菌属(*Acinetobacter* spp.)等微生物,可能会成为药品工艺污染监控的重点。由于寡营养微生物的生长特性和培养条件与传统方法监测的人源性微生物有较大差异,适时引入专属的寡营养微生物监测技术可以有助于发现生产过程中的潜在风险,为基于风险的质量管理提供数据。

本研究结果显示平皿倾注法的菌落计数结果优于薄膜过滤。可能是因为薄膜的有效过滤面积较小,菌落易重叠,同时在薄膜上不易观察微小菌落,更易被掩盖。本研究中发现,在 R<sub>2</sub>A 中分离的 3 种微生物,即 *Bacillus altitudinis*、*Brevibacillus agri* 和 *Brevibacillus choshinensis*,虽也可在 TSA 培养基中生长,但其生长较为缓慢,培养超过 5 d 后仍较难识别。与水系统微生物存活状态不同,空气中微生物分布具有更大随机性。使用空气采样器的采样效率和重复性较水样采集方法差<sup>[31]</sup>。虽然,在洁净环境监测结果中 R<sub>2</sub>A 和 TSA 培养基的菌落计数结果在统计上



A. R<sub>2</sub>A 培养基 (R<sub>2</sub>A medium) B. TSA 培养基 (TSA medium)

图 3 制药环境中 R<sub>2</sub>A 和 TSA 培养基中微生物的分离率

Fig. 3 Isolation rates of microorganisms in R<sub>2</sub>A and TSA media in pharmaceutical environment

不显著,可能与洁净环境的“零”值结果较多有关,但 R<sub>2</sub>A 培养基可复苏更为丰富的微生物种群。另一方面, TSA 培养基的检测时间较短(2~3 d),有利于企业对时间成本的控制。企业在选择监控方法时,可以考虑以传统环境监控技术为基础,辅以寡营养检测技术,基于风险评估原则建立质量风险管理原则下的环境微生物质量控制技术体系,分析微生物污染控制中的风险,有效发现生产过程中的潜在不可接受微生物,有助于指导环境消毒、方法验证等过程控制方式,消除潜在隐患。

本研究比较了 R<sub>2</sub>A 和 TSA 培养基在制药用纯化水系统和常见洁净环境生物负载监测的微生物计数和鉴定结果,初步形成了较为完善的寡养环境微生物过程监控模式,为制定微生物污染控制策略提供

有效信息。提高实验室对环境微生物种群多样性的监测能力,完善制药环境微生物的质量监控体系,为企业质量风险管理提供案例参考。

参考文献

[ 1 ] KUZNETSOV SI, DUBININA GA, LAPTEVA NA. Biology of oligotrophic bacteria [J]. Annu Rev Microbiol, 1979, 33(1): 377

[ 2 ] WILLIAMS MM, ARMBRUSTER CR, ARDUINO MJ. Plumbing of hospital premises is a reservoir for opportunistically pathogenic microorganisms: a review [J]. Biofouling, 2013, 29(2): 147

[ 3 ] FAVERO MS, CARSON LA, BOND WW, et al. Pseudomonas aeruginosa: growth in distilled water from hospitals [J]. Science, 1971, 173(3999): 836

[ 4 ] FEAZEL LM, BAUMGARTNER LK, PETERSON KL, et al. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(38): 16393

- [ 5 ] GAO XL, SHAO MF, WANG Q, *et al.* Airborne microbial communities in the atmospheric environment of urban hospitals in China [J]. *J Hazard Mater*, 2018, 349(5): 10
- [ 6 ] BEER DD, SRINIVASAN R, STEWART PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(12): 4339
- [ 7 ] 韩东东, 郝振宇, 高广海, 等. 寡营养细菌及其生态作用和应用的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2012, 39(4): 526  
HAN DD, HAO ZY, GAO GH, *et al.* Ecological function of oligotrophic bacteria and their applications in the environment [J]. *Microbiol China*, 2012, 39(4): 526
- [ 8 ] ZLATKIN IV, VISHNEVETSKAIA OI, NIKITIN DI. Some aspects of antibiotic resistance of oligotrophic bacteria [J]. *Antibiot Chemother*, 1991, 36(3): 34
- [ 9 ] MITTELMAN MW, JONES ADG. A pure life: the microbial ecology of high purity industrial waters [J]. *Microb Ecol*, 2018, 76(1): 9
- [ 10 ] RAMAMURTHY T, GHOSH A, PAZHANI GP, *et al.* Current perspectives on viable but non – culturable (VBNC) pathogenic bacteria [J]. *Front Public Health*, 2014, 2(103): 1
- [ 11 ] KÉKI Z, GRÉBNER K, BOHUS V, *et al.* Application of special oligotrophic media for cultivation of bacterial communities originated from ultrapure water [J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2013, 60(3): 345
- [ 12 ] FALKINHAM JO, PRUDEN A, EDWARDS M. Opportunistic premise plumbing pathogens: increasingly important pathogens in drinking water [J]. *Pathogens*, 2015(4): 373
- [ 13 ] KOVALEVA J, DEGENER JE, VAN DER MEI HC. *Methylobacterium* and its role in health care – associated infection [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(5): 1317
- [ 14 ] TADA Y, IHMORI M, YAMAGUCHI J. Oligotrophic bacteria isolated from clinical materials [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(2): 493
- [ 15 ] NAGARKAR PP, RAVETKAR SD, WATVE MG. Oligophilic bacteria as tools to monitor aseptic pharmaceutical production units [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(3): 1371
- [ 16 ] FUHRMAN JA, CAMPBELL L. Marine ecology: microbial microdiversity [J]. *Nature*, 1998, 393(6684): 410
- [ 17 ] WATVE M, SHEJVAL V, SONAWANE C, *et al.* The ‘K’ selected oligophilic bacteria: a key to uncultured diversity? [J]. *Curr Sci*, 2000, 78(12): 1535
- [ 18 ] 范一灵, 蒋波, 房蕊, 等. 药品无菌检查中微生物污染的鉴定和污染溯源分析 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(6): 1067  
FAN YL, JIANG B, FANG R, *et al.* Identification and characterization of bacterial contaminations isolated from drug sterility test [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2011, 31(6): 1067
- [ 19 ] 范一灵, 冯震, 钟玮, 等. 无菌药品生产企业核心区微生物污染调查与分析 [J]. *中国药事*, 2014, 31(6): 586  
FAN YL, FENG Z, ZHONG W, *et al.* Microbiological investigation and analysis of core area of sterile drug in pharmaceutical manufacture [J]. *Chin Pharm Aff*, 2011, 31(6): 1067
- [ 20 ] MARINELLI L, COTTARELLI A, SOLIMINI AG, *et al.* Evaluation of timing of re – appearance of VBNC *Legionella* for risk assessment in hospital water distribution systems [J]. *Ann Ig*, 2017, 29(5): 431
- [ 21 ] ZHANG J, YANG H, LI J, *et al.* Current perspectives on viable but non – culturable foodborne pathogenic bacteria: a review [J]. *Foods*, 2023, 12(6): 1179
- [ 22 ] RAY J. Microbiological monitoring of dialysis water systems – which culture method? [J]. *J Ren Care*, 2007, 33(2): 66
- [ 23 ] TADA Y, IHMORI M, YAMAGUCHI J. Oligotrophic bacteria isolated from clinical materials [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(2): 493
- [ 24 ] LAGIER JC, KHELAIFIA S, ALOU MT, *et al.* Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics [J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1: 16203
- [ 25 ] AHN Y, LEE UJ, LEE YJ, *et al.* Oligotrophic media compared with a tryptic soy agar or broth for the recovery of *Burkholderia cepacia* complex from different storage temperatures and culture conditions [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2019, 29(10): 1495
- [ 26 ] 李珏, 洪利娅, 王知坚, 等. 制药用水微生物限度检查新方法的研究 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(2): 376  
LI J, HONG LY, WANG ZJ, *et al.* Development of a new microbial limit testing method for pharmaceutical water [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(2): 376
- [ 27 ] REASONER DJ, GELDREICH EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49(1): 1
- [ 28 ] 宋明辉, 范一灵, 秦峰, 等. 激光解吸快速菌种鉴定与不同前处理方法对常见食源性致病菌菌种的鉴定分析 [J]. *上海预防医学*, 2020, 32(5): 375  
SONG MH, FAN YL, QIN F, *et al.* Evaluation of different samples pretreatment method of MALDI – TOF MS on the identification of common foodborne pathogens [J]. *Shanghai J Prev Med*, 2020, 32(5): 375
- [ 29 ] 范一灵, 房蕊, 蒋波, 等. 微生物鉴定分型技术应用于医药企业微生物污染调查 [J]. *中国医药工业杂志*, 2010, 41(11): 810  
FAN YL, FANG R, JIANG B, *et al.* Application of identification and characterization methods for microbial contamination survey in pharmaceutical industry [J]. *Chin J Pharm*, 2010, 41(11): 810
- [ 30 ] TIDSWEL EC, BOONE K. Environmental and personnel monitoring programs – a risk – based case study of *Cutibacterium acnes* [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2020, 74(4): 408
- [ 31 ] 李涛, 空气微生物采样及发展趋势 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2003, 13(5): 538  
LI T. Airborne microbiological sampling and future trends [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2003, 13(5): 538

(本文于2024年5月29日收到)