嗜热脂肪地芽孢杆菌的芽孢在 4 种溶液中的 D 值比较研究

王似锦，褚　婧，马仕洪*

（中国食品药品检定研究院，国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室，北京 100050）

摘要：将嗜热脂肪地芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*，ATCC7953）的芽孢悬浮于不同的溶液中，采用残存曲线法测定 121 ℃下的耐受性（D 值）并进行比较。结果表明，嗜热脂肪地芽孢杆菌的芽孢在纯化水、胰酪大豆胨（TSB）液体培养基、5%葡萄糖注射液和碳酸氢钠注射液中的 D 值分别为 3.26、3.61、0.97 和 2.94 min。芽孢在不同介质中所表现出的耐受性不同，因此在灭菌工艺验证过程中进行生物学确认时，选择芽孢和生物指示剂应考虑芽孢在不同溶液中耐受性的差异，应根据所测定的不同 D 值计算初始的芽孢接种量，以得到准确的生物杀灭力，使灭菌工艺的热力学杀灭效果保持足够的冗余，从而提供足够的无菌保证水平。

关键词：生物指示剂；嗜热脂肪地芽孢杆菌；芽孢；残存曲线法；耐热性；D 值

中图分类号：R187　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)01-0131-04

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.01.016

Comparison of D Values of *Geobacillus stearothermophilus* Spores in Different Solutions

WANG Sijin, CHU Jing, MA Shihong*

(*NMPA Key Lab. for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050*)

ABSTRACT: In this paper, spores of *Geobacillus stearothermophilus* were inoculated to different solutions, and their heat resistances (D values) were determined by the survivor curve method. The results indicated that D values of spores of *Geobacillus stearothermophilus* in purified water, trypticase soy broth (TSB) medium, 5% glucose injection, and sodium bicarbonate injection were 3.26, 3.61, 0.97, and 2.94 min, respectively. So, differences in heat resistance of spores in different solutions should be generally considered when selecting spores and biological indicators, and the inoculum size should be calculated by D values to get more accurate biological lethality in the biological qualification of sterilization validation, and keep enough safety margin for the thermal lethality in order to provide sufficient sterility assurance level in the sterilization process performance qualification of the parenteral drugs.

Key Words: biological indicator; *Geobacillus stearothermophilus*; spore; survivor curve method; heat resistance; D value

湿热灭菌是指将物品置灭菌设备内，利用饱和蒸汽、蒸汽 - 空气混合物、蒸汽 - 空气 - 水混合物、过热水等使微生物菌体中的蛋白质、核酸发生变性而杀灭微生物的方法[1—3]。根据被灭菌物品的特点不同，热传递的方式有所差别，其灭菌过程和所关注的控制点也不同。多孔或坚硬物品可采用饱和蒸汽直接接触的方式进行灭菌；装有液体的密闭容器（例如常见的瓶装、输液袋包装的注射液，以下统称为液体产品），灭菌介质先将热传递到容器表面，再通过传导和对流的方式来实现内部液体的灭菌[3]。国内外的行业指南和技术文件均要求：当对液体产品采用湿热灭菌时，灭菌验证中的生物学确认部分应使用生物指示剂，根据生物指示剂被杀灭的程度来评价灭菌程序的有效性，从而可以计算出该灭菌条件下能够达到的无菌保证水

收稿日期：2022-10-26

作者简介：王似锦(1982—)，男，副主任药师，从事药品微生物检验与控制的研究。

通信作者：马仕洪(1972—)，男，主任药师，从事药物分析、药品微生物检验与控制的研究。

E-mail：mash@nifdc.org.cn

平（sterility assurance level，SAL）[1—4]。为了确定生物学确认试验时的初始接种量以及后续 SAL 的估算，在进行工艺验证之前，有必要对生物指示剂在液体产品中的耐受性进行研究。生物指示剂或芽孢的耐受性通常用 D 值来表示，指灭菌过程中将生物指示剂中的微生物杀灭 90%（下降 1 个对数单位）所需的时间，单位为 min。常采用嗜热脂肪地芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、萎缩芽孢杆菌（*Bacillus atrophaeus*）和生孢梭状芽孢杆菌（*Clostridium sporogenes*）等作为湿热灭菌的生物指示剂 [1—3]。因为嗜热脂肪地芽孢杆菌的芽孢耐受性较强，所以其在湿热灭菌验证、监控中的应用较为广泛。

本研究将嗜热脂肪地芽孢杆菌的芽孢分别加至不同介质（水、培养基、5%葡萄糖注射液、碳酸氢钠注射液）中，测定其 D 值，并进行了比较分析，以进一步明确了生物指示剂在湿热灭菌验证中的作用。本研究有助于灭菌工艺验证中生物学确认工作的开展，为无菌药品的工艺研究、验证和持续改进提供了数据参考。

1　仪器与试药

CD-B13 Polystat 型油浴仪（美国 Cole-Parmer 仪器公司）；KD240 型恒温培养箱（德国 Binder 公司）；BX53 型显微镜（美国奥林巴斯公司）；毛细管（华西医科大学仪器厂，一端封口玻璃毛细管，硬质中性玻璃，内径 0.9 ～ 1.1 mm，壁厚 0.10 ～ 0.15 mm，管长 100 mm）。

碳酸氢钠注射液（A 厂家，批号 200701、200702、200703）；5% 葡萄糖注射液（B 厂家，批号 190702、190703、190704）；胰酪大豆胨（TSB）液体培养基和胰酪大豆胨琼脂（TSA）培养基均购自美国 BD 公司；营养琼脂培养基购自北京三药科技开发公司；灭菌纯化水为实验室纯化水，经 121 ℃、15 min 湿热灭菌后使用。

嗜热脂肪地芽孢杆菌（ATCC7953），购自美国典型微生物菌种保藏中心（American Type Culture Collection，ATCC）。

2　方法与结果

2.1　芽孢悬液的制备

将甘油冷冻管内保存的嗜热脂肪地芽孢杆菌接种至 TSB 培养基中，57 ℃培养 24 h；取培养液接种至营养琼脂斜面培养基，57 ℃培养 24 h，然后于 33 ℃继续培养 72 ～ 96 h。将菌苔刮下，加入灭菌纯化水制成芽孢悬液，通过 95 ℃加热 20 min 去除残存的营养体，置 2 ～ 8 ℃冰箱保存待用。制备的芽孢悬液浓度为 10^7 ～ 10^8 cfu/mL。

2.2　毛细管的制备

将制备好的芽孢悬液加入一端封口的毛细管内，每支 50 μL，芽孢数量为 5×10^5 ～ 5×10^6 cfu，将另一端用火焰熔封，置 2 ～ 8 ℃环境中暂存备用。

2.3　油浴热处理。

将上述含芽孢悬液的毛细管置 121 ℃恒温油浴中，分别处理一定时间，取出后迅速置冰水浴内冷却 5 min，然后取出。将毛细管置 75%乙醇中浸泡 1 ～ 2 min，取出后用灭菌纯化水冲洗外表面 2 次。每个灭菌点至少平行试验 4 支。

预试验结果表明，芽孢在不同介质中的耐受性不同。因此，为了优化线性拟合，每一种介质的灭菌时间间隔也不同。灭菌纯化水和 TSB 培养基分别处理 0、3、6、9、12、15 min；5%葡萄糖注射液处理 0、2、4、6、8 min；碳酸氢钠注射液处理 0、3、6、9、12 min。

2.4　芽孢计数。

将清洗完毕的毛细管置装有玻璃珠的灭菌试管内，涡旋打碎，用灭菌纯化水 10 倍梯度稀释，用 TSA 培养基培养，以平皿法计数嗜热脂肪地芽孢杆菌，培养温度 56 ℃，培养时间 48 h。

2.5　数据处理

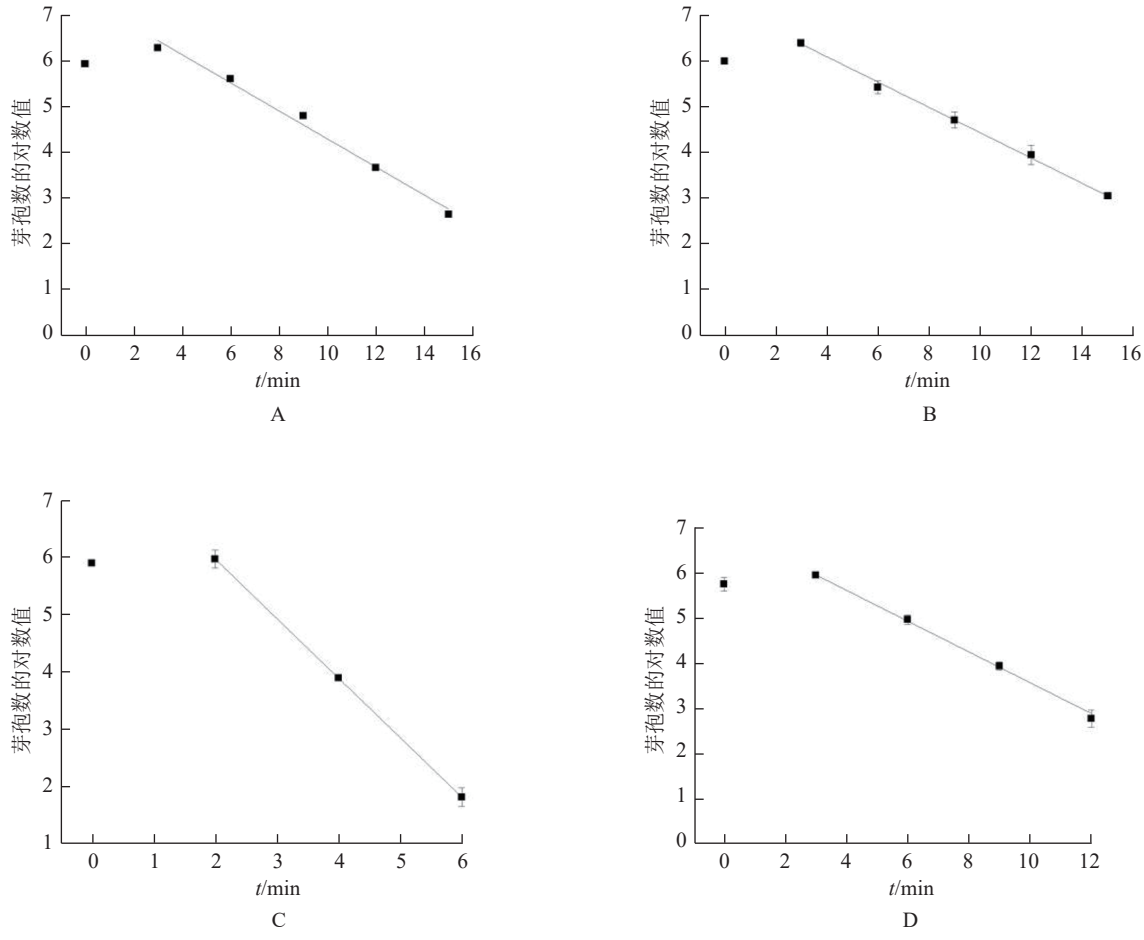
以热处理时间为横坐标、芽孢计数的对数值为纵坐标，拟合线性方程，并计算 D 值。

嗜热脂肪地芽孢杆菌的芽孢悬液在 121 ℃的不同介质中的残存曲线如图 1 所示。D 值结果如表 1 所示。

3　讨论与分析

3.1　残存曲线的拟合结果

嗜热脂肪地芽孢杆菌的芽孢残存曲线在 4 种介质中均出现了“肩峰（shoulder）”，即零点脱离线性方程的现象（与初始时间点相比，第一个灭菌时



A—灭菌纯化水；B—TSB 培养基；C—5%葡萄糖注射液；D—碳酸氢钠注射液。

图 1 嗜热脂肪地芽孢杆菌的芽孢在不同介质中的残存曲线

Fig.1 Survival Curves of Spores of *Geobacillus stearothermophilus* in Different Media

表 1 嗜热脂肪地芽孢杆菌的芽孢在不同介质中的 D 值

Tab.1 D Values for Spores of *Geobacillus stearothermophilus* in Different Media

介质	拟合方程[1)]	D值/min	相关系数R^2
灭菌纯化水	$y=-0.307\,0x+7.358\,9$	3.26	0.990 2
TSB培养基	$y=-0.277\,2x+7.202\,3$	3.61	0.999 0
5%葡萄糖注射液	$y=-1.031\,0x+8.003\,0$	0.97	0.999 9
碳酸氢钠注射液	$y=-0.340\,2x+6.971\,7$	2.94	0.998 7

注：[1)] y 表示芽孢数的对数值；x 表示热处理时间。

间点的芽孢数对数下降值较小，导致初始时间点严重脱离线性方程）[5—7]。在进行线性拟合时，如果将所有点包括在内，则所得线性方程的相关系数较低；如果舍去初始时间点，则相关系数普遍提高。ISO 11138-1（Sterilization of Health Care Products-biological Indicators Part 1：General Requirements）和《中华人民共和国药典》2020 年版四部 9208 生物指示剂耐受性检查法指导原则中都明确指出，进行回归分析或线性拟合时可剔除不合理的数据点（灭菌后芽孢数对数值下降未超过 0.5 的数据点）[1,8]。因此，本研究中舍去初始时间点后再进行 D 值计算。

此外，葡萄糖注射液灭菌 8 min 时的芽孢计数结果已经接近 0，无法计算结果，因此线性拟合时舍去该点。

3.2 芽孢悬液在不同介质中的 D 值差异

虽然使用同一菌种、同一批次芽孢悬液，但介质不同仍会影响到芽孢的 D 值[9—11]。有文献[12]报道，嗜热脂肪地芽孢杆菌芽孢在不同注射剂中的 D 值存在差异，例如，其在注射用水中的 $D_{121\,℃}$ 值为

3.37 min，在生理盐水中的 $D_{121\,℃}$值为 2.78 min，在 5%葡萄糖注射液中的 $D_{121\,℃}$值为 1.97 min，在林格注射液中的 $D_{121\,℃}$值为 2.82 min，在 20%甘露醇注射液中的 $D_{121\,℃}$值为 3.24 min。我国药品审评中心在 2020 年发布的《化学药品注射剂灭菌和无菌工艺研究及验证指导原则（试行）》[4] 中提到："由于生物指示剂在不同介质或环境中的耐受性会有所不同，所以无论是将生物指示剂接种到待灭菌产品的方法，或直接使用市售的生物指示剂成品，均应考虑待灭菌产品对细菌芽孢耐受性的影响，如果待灭菌产品会使芽孢的耐受性增加，应采用直接接种到待灭菌产品的方法。"本研究结果显示，嗜热脂肪地芽孢杆菌的芽孢悬液在灭菌纯化水中的 $D_{121\,℃}$值为 3.26 min；在 TSB 培养基中的 $D_{121\,℃}$值为 3.61 min；在碳酸氢钠注射液中的 $D_{121\,℃}$值为 2.94 min，略低于灭菌纯化水和 TSB 培养基；在 5%葡萄糖注射液中的 $D_{121\,℃}$值为 0.97 min，明显低于灭菌纯化水和 TSB 培养基。另外，需要说明的是，不同实验室制备芽孢悬液的条件不同，因此即使是同一种介质，不同实验室之间的绝对数值的比较是没有意义的，例如本次试验得 5%葡萄糖注射液中的 $D_{121\,℃}$值为 0.97 min，而文献[12] 中得到的 $D_{121\,℃}$值为 1.97 min。

3.3 不同介质中 D 值的差异对初始接种量的影响

在对液体进行灭菌验证时，生物学确认应计算初始芽孢的接种量（或称为生物指示剂的接种量）[3—4]，计算公式如下。

$$\lg N_0=F_T/D_T+\lg N_T \qquad ①$$

式中，F_T为灭菌工艺中的期望灭菌值（温度为 T 时）；D_T 为生物指示剂在 T 温度下的耐受性；N_0 为灭菌前生物指示剂的初始菌数；N_T 为灭菌后生物指示剂的残存菌数。

一般在灭菌验证时，要求灭菌后所有生物指示剂为阴性结果（即全部杀灭），则 N_T 实际能够达到 10^{-1} ～ 10^{-2} cfu，甚至更低。但是，为了增加灭菌保证的安全边际，一般取 N_T=1，即 $\lg N_T$=0。

式①中，当生物指示剂确定后，其 D_T 可确定，灭菌工艺确定后，所期望的灭菌值 F_T 可确定，$\lg N_T$ 取 0，则可计算 N_0。

例如，本研究所涉及的 4 种介质，如果使用 F_0=12 min 的湿热灭菌工艺（即 121 ℃灭菌 12 min）进行灭菌，其芽孢的初始接种量分别为：灭菌纯化水 4.8×10^3 cfu；TSB 培养基 1.8×10^3 cfu；碳酸氢钠注射液 1.6×10^4 cfu；5%葡萄糖注射液 2.3×10^{12} cfu。可见，芽孢悬液在不同介质中的 D 值会显著影响灭菌验证时芽孢的初始接种量。

对于 D 值较低的溶液，例如 5%葡萄糖注射液，所计算出的初始接种量太高（2.3×10^{12} cfu），实际工作中无法得到如此高浓度的芽孢悬液，可以使用安瓿瓶装的自含式生物指示剂，将其置灭菌容器中进行灭菌验证。这种情况下，应比较芽孢在自含式生物指示剂所含的培养基中的 D 值（例如 TSB 培养基）与被灭菌液体（例如 5%葡萄糖注射液）的 D 值，前者应高于后者（3.61 min>0.97 min），使灭菌工艺的热力学杀灭效果有更多的冗余，从而使 SAL ≤ 10^{-6}。

综上所述，芽孢在不同介质中所表现出的耐受性（D 值）不同，在灭菌工艺验证的生物学确认时，应根据所测定的不同 D 值计算初始的芽孢接种量，从而得到准确的生物杀灭力。在注射剂的灭菌工艺验证中，应考虑芽孢在不同溶液中耐受性的差异，通过选择合适的灭菌工艺，使其热力学杀灭效果保持足够的冗余，从而提供足够的无菌保证水平。本研究考察了嗜热脂肪地芽孢杆菌的芽孢在常见的 4 种介质（灭菌纯化水、TSB 培养基、5%葡萄糖注射液和碳酸氢钠注射液）中的 D 值，其中 TSB 培养基中的 D 值较大，其次是纯化水和碳酸氢钠注射液，5%葡萄糖注射液中的 D 值较小。本研究将有助于药品研发和生产企业灭菌工艺验证的生物学确认工作的开展，能够指导无菌药品的工艺研究、验证和持续改进。

参考文献：

[1] 潘友文, 邓海根. 灭菌工艺的基本原理与参数放行[M]. 北京：中国质检出版社, 中国标准出版社, 2013.

（下转第153页）

到切实提升。

此外，SPC 的应用不仅只限于原料药的质量回顾，还可扩展到不同工艺生产的制剂产品中。与此同时，SPC 还可与风险管理相结合，通过量化质量风险管理执行过程中的风险评估、风险控制、风险回顾等多个环节，为风险管理提供强有力的统计学依据，使药品生产质量管理体系运作水平得到持续提升与完善。

参考文献：

[1] 梁 毅, 孙黄颖, 沈启雯. 控制图在药品生产质量趋势分析及异常定位管理中的应用[J]. 中国药房, 2016, **27**(10): 1297-1301.

[2] SHARMA R G, DAS A, SUMAN S. Framework -based on SQC and DMAIC to monitor die casting process parameters [J]. *Int J Ind Syst Eng*, 2016, **23**(2): 204-222.

[3] MOORE S S, MURPHY E. Process visualization in medicaldevice manufacture: an adaptation of short run SPC techniques [J]. *Qual Eng*, 2013, **25**(3): 247-265.

[4] 张 迪, 宋建英, 孙 宽, 等. 统计过程控制法评价奥扎格雷钠氯化钠注射液的工艺过程控制能力[J]. 中国药师, 2012, **15**(11): 1660-1661.

[5] 王永香, 李璐米, 慧 娟, 等. 统计过程控制技术在热毒宁注射液生产过程能力分析中的应用[J]. 中成药, 2017, **39**(11): 2297-2300.

[6] 黄 玲, 万红丽. 统计过程控制在软胶囊压丸装量控制中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, **7**(10): 4192-4197.

[7] 周建敏, 曹凤习. 休哈特控制图在药品检验中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2014, **31**(1): 116-119.

[8] 王永智, 邱文娜, 史长军, 等. 休哈特控制图在药品水分含量测定中的应用[J]. 西北药学杂志, 2015, **30**(5): 578-581.

[9] 王 辉, 李 俊, 刘永翔, 等. 统计过程控制结合HACCP对苦荞饭中黄曲霉毒素防控的研究[J]. 保鲜与加工, 2019, **19**(4): 68-74.

[10] 梁 毅. GMP教程[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019: 264-266.

[11] KOTZ S, JOHNSON N L. Process capability indices-A Review 1992-2000[J]. *J Qual Technol*, 2002, **34**(1): 2-19.

[12] 陈俊芳. 质量管理学[M]. 北京: 中国标准出版社, 2004: 55-65.

（上接第134页）

[2] MOLDENHAUER J. Thermal validation in moist heat sterilization [M]. Bethesda: PDA, 2015.

[3] PDA. Technical report No.1 validation of moist heat sterilization processes cycle design, development, qualification and ongoing control [S]. Bethesda: PDA, 2007: 1-52.

[4] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药品注射剂灭菌和无菌工艺研究及验证指导原则(试行)[EB/OL]. (2020-12-30)[2022-02-16]. https://www. cde. org. cn/main/att/download/85debcdc18ae4d9cce26591ef0c4b747.

[5] LICCIARDELLO J J, NICKERSON J T. Some observations on bacterial thermal death time curves [J]. *Appl Microbiol*, 1963, **11**(6): 476-480.

[6] TAKAHASHI M, HATAYEYAMA K, TANI H S, *et al*. Comparison of D-value accuracy among limited Spearman-Karber Procedure, Stumbo-Murphy Cochran Procedure(SMCP) and limited SMCP [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 1995, **49**(5): 220-225.

[7] SHINTANI H, AKERS J E. On the cause of performance variation of biological indicator used for sterility assurance [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2000, **54**(5): 332-342.

[8] ISO. ISO 11138-1, Sterilization of health care products-biological indicators part 1: general requirements [S]. Geneva: ISO, 2017: 17-36.

[9] GAUTHIER C A, SMITH G M, PFLUG I J. Effect of phosphate buffer concentration on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in parenteral solutions [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1978, **36**(3): 457-464.

[10] BERGER T J, NELSON P A. The effect of formulation of parenteral solutions on microbial growth measurement of D- and Z-values [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 1995, **49**(1): 32-41.

[11] BERGER T J, CHAVES C, TEW R D, *et al*. Biological indicator comparative analysis in various product formulations and closure sites [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2000, **54**(2): 101-109.

[12] PENNA T C V, MARQUES M, MACHOSHVILI I A, *et al*. The effect of composition of parenteral solution on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis* spores [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, **98-100**(1-9): 539-551.