基于 16S rRNA 测序的制药生产环境微生物菌种分布特征研究

姚 瑛，宣 泽，王 霞，张光华，江志杰*

（北京市药品检验研究院，国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室，中药成分分析与生物评价北京市重点实验室，北京 102206）

摘要：药品生产环境微生物污染控制是保障药品质量安全的关键。该研究利用 16S rRNA 测序技术，分析来源于制药企业空调系统（42 株）、设备表面（11 株）、人员工作服（25 株）和水系统（20 株）的共 98 株微生物样本的群落分布特征。结果显示，不同来源的微生物群落结构差异显著：空调系统以放线菌纲、芽孢杆菌纲和 γ- 变形菌纲为主；人员和设备样本中芽孢杆菌纲和放线菌纲占优；水系统以 α-、β- 和 γ- 变形菌纲为主，且与其他环境无交叉分布。跨环境同源菌株分析结果显示，空调、设备和人员环境中存在共有菌株，提示空气流动、人员接触及设备表面是此类菌株的潜在传播途径。建议制药企业建立环境菌种库，结合动态监测结果和系统进化分析，以实现环境微生物风险的精准防控。

关键词：环境微生物学；污染控制；16S rRNA 测序；系统发育树；微生物溯源

中图分类号：R95；TQ460.8^{+}2　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)08-1077-09

引用：姚 瑛，宣 泽，王 霞，等．基于 16S rRNA 测序的制药生产环境微生物菌种分布特征研究［J］．中国医药工业杂志，2025, **56**(8)：1077-1085．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.08.015

Research on Distribution Characteristics of Microbial Strains in Pharmaceutical Production Environment Based on 16S rRNA Sequencing

YAO Ying, XUAN Ze, WANG Xia, ZHANG Guanghua, JIANG Zhijie*

(*Beijing Key Lab. of Analysis of Traditional Chinese Medicine Components and Biological Evaluation, National Medical Products Administration Key Lab. of Generic Drug Research and Evaluation, Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206*)

ABSTRACT: Microbial contamination control in pharmaceutical production environments is crucial for ensuring drug quality. This study utilized 16S rRNA sequencing to comprehensively analyze the distribution characteristics of 98 microbial isolates collected from air conditioning systems (42 isolates), equipment surfaces (11 isolates), personnel workwear (25 isolates), and water systems (20 isolates). Results showed that microbial community structures varied significantly across sources. Air conditioning systems were dominated by Actinomycetes, Bacilli, and Gammaproteobacteria; Bacilli and Actinomycetes predominated in personnel workwear and equipment samples; water systems exhibited a distinct prevalence of α-, β-, and γ-Proteobacteria with no cross-distribution to other environments. Cross-environmental analysis revealed shared strains among air conditioning systems, equipment, and personnel, suggesting airflows, human contact, and equipment surfaces as potential transmission routes. It is recommended that pharmaceutical enterprises should establish environmental strain banks, integrating dynamic monitoring results and phylogenetic analyses to achieve precise microbial risk management.

Key Words: environmental microbiology; contamination control; 16S rRNA sequencing; phylogenetic tree; microbial traceability

药品生产环境的微生物污染控制是保障药品质量安全的核心环节。2012 年至 2023 年的美国 FDA 年度报告显示，微生物污染导致的药品召回事件占所有质量缺陷事件的 37%，其中环境控制失效为主要诱因 [1]。传统监测方法的溯源能力不足，难以满足《药品生产质量管理规范（2010 年修订）》对“基于风险的全过程控制”的要求。近年来，分子生物学技术 16S rRNA 测序为环境微生物监测及溯源提供了新途径，结合系统发育分析，能揭示复杂环境菌群结构并追溯微生物传播路径 [2—4]。

微生物群落结构与环境特征密切相关，不同来源的微生物分布可能反映其生态适应性和潜在健康风险 [3]。现有研究多聚焦于单一环境类型（如洁净室空气或水系统），缺乏对制药企业多源微生物交互作用的系统研究，尤其对人员 - 设备 - 空调系统 - 水系统的交叉污染机制认知不足 [4]。本研究通过整合 4 类关键环境介质的污染微生物种群数据，系统分析了空气 - 物体表面 - 水系统 - 人员流动的微生物分布关联性，为揭示多源环境交叉污染机制提供了新视角，弥补了现有研究仅针对单一环境类型的局限性。

1　仪器与材料

T100 型 PCR 扩增仪（美国 BIO-RAD 公司）；LRH-250 型生化培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）。

胰酪大豆胨琼脂培养基（tryptic soy agar medium，TSA，美国 BD 公司，批号 1201798）；TIANgel Midi Purification 离心柱型 PCR 产物回收试剂盒（批号 X1028）和快速 DNA 提取检测试剂盒（批号 Y1203）均购于天根生化科技（北京）有限公司。

2　方法与结果

2.1　样本采集

研究分离的 98 株微生物样本来源于某体外诊断试剂生产企业每周从空调系统、人员工作服、设备表面和水系统监测中获得的微生物样本。其中，源于空调系统、人员工作服、设备表面和水系统的微生物分别为 42、25、11 和 20 株。环境微生物样本采集包括浮游菌、沉降菌、表面微生物、水系统微生物。浮游菌、沉降菌、表面微生物、水系统微生物分别依据《医药工业洁净室（区）浮游菌的测试方法：GB/T16293—2010》[5]、《医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法：GB/T 16294—2010》[6]、《洁净室施工及验收规范：GB 50591-2010》[7]、ChP 2020 年版纯化水项下的要求进行检查。

2.2　DNA 提取及 16S rRNA 扩增测序

按照快速 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA。扩增引物序列 [8] 为 27F（5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'）；1492R（5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'）（由赛默飞世尔科技公司合成）。

PCR 程序：预变性 94 ℃，3 min；扩增变性 94 ℃，30 s，退火 56 ℃，30 s，延伸 72 ℃，1 min（共 35 个循环）；延伸 72 ℃，5 min；4 ℃保存备用。

委托北京三博远志生物科技有限公司对所得 PCR 产物采用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳进行分析，并采用 PCR 产物回收试剂盒回收目的片段后进行测序。

2.3　菌种鉴定

将测序结果与美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）16S RefSeq 数据库进行比对，设置置信度阈值≥ 0.9，注释纲、目、科、属水平分类信息。本研究共分析了 98 株环境样本，鉴定出 63 个物种，隶属于 35 个属、24 个科、13 个目和 6 个纲（表 1）。如图 1 所示，各来源样本在纲水平上的菌群组成呈现明显的差异。空调系统样本中菌种以放线菌纲（13，30.95%）、芽孢杆菌纲（11，26.19%）和 γ- 变形菌纲（11，26.19%）为主；人员样本中菌种以芽孢杆菌纲（13，52.00%）、放线菌纲（12，48.00%）为主；设备样本中菌种以芽孢杆菌纲（5，45.45%）和放线菌纲（4，36.36%）为主；水样本中菌种以 α- 变形菌纲（7，35.00%）、β- 变形菌纲（6，30.00%）和 γ- 变形菌纲（6，30.00%）为主。

2.4　菌株发育树分析

使用 Mega 11.0.13 软件，采用 MUSCLE 算法

收稿日期：2025-03-25

作者简介：姚　瑛，副主任药师，从事药品、保健食品及洁净环境检测工作。

通信作者：江志杰，主任药师，硕士研究生，专业方向：药品微生物检验、质量研究及洁净环境检测。

表 1 不同来源样本的微生物分类学分布统计

Tab.1 Taxonomic Distribution Statistics of Microbial Samples

样品来源	纲	目	科	属	菌种数
空调（A）	放线菌纲 Actinomycetes	微球菌目 Micrococcales	微球菌科 *Micrococcaceae*	微球菌属 *Micrococcus*	5
				考克氏菌属 *Kocuria*	2
				节杆菌属 *Arthrobacter*	1
				假节杆菌属 *Pseudarthrobacter*	1
			纤维素单胞菌科 *Cellulomonadaceae*	放线菌属 *Actinotalea*	1
			微杆菌科 *Microbacteriaceae*	微杆菌属 *Microbacterium*	1
		分枝杆菌目 Mycobacteriales	棒状杆菌科 *Corynebacteriac*	棒状杆菌属 *Corynebacterium*	2
	芽孢杆菌纲 Bacilli	芽孢杆菌目 Bacillales	葡萄球菌科 *Staphylococcaceae*	葡萄球菌属 *Staphylococcus*	7
				咸海鲜芽孢杆菌属 *Jeotgalicoccus*	1
			芽孢杆菌科 *Bacillaceae*	近芽孢杆菌属 *Peribacillus*	1
				芽孢杆菌属 *Bacillus*	1
			动性球菌科 *Planococcaceae*	芽孢八叠球菌属 *Sporosarcina*	1
	γ- 变形菌纲 Gammaproteobacteria	假单胞菌目 Pseudomonadales	莫拉菌科 *Moraxellaceae*	莫拉菌属 *Moraxella*	4
				不动杆菌属 *Acinetobacter*	2
			假单胞菌科 *Pseudomonadaceae*	假单胞菌属 *Pseudomonas*	5
	α- 变形菌纲 Alphaproteobacteria	鞘脂单胞菌目 Sphingomonadales	鞘脂单胞菌科 *Sphingomonadaceae*	鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*	2
		柄杆菌目 Caulobacterales	柄杆菌科 *Caulobacteraceae*	短波单胞菌属 *Brevundimonas*	1
		红螺菌目 Rhodospirillales	醋杆菌科 *Acetobacteraceae*	玫瑰单胞菌属 *Roseomonas*	1
	β- 变形菌纲 Betaproteobacteria	伯克氏菌目 Burkholderiales	草酸杆菌科 *Oxalobacteraceae*	马塞菌属 *Massilia*	3
人员（H）	芽孢杆菌纲 Bacilli	芽孢杆菌目 Bacillales	芽孢杆菌科 *Bacillaceae*	芽孢杆菌属 *Bacillus*	5
				近芽孢杆菌属 *Peribacillus*	1
				胞囊杆菌属 *Cytobacillus*	1
				普里斯特菌属 *Priestia*	1
			葡萄球菌科 *Staphylococcaceae*	葡萄球菌属 *Staphylococcus*	4
			类芽孢杆菌科 *Paenibacillaceae*	类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*	1
	放线菌纲 Actinomycetes	微球菌目 Micrococcales	微球菌科 *Micrococcaceae*	微球菌属 *Micrococcus*	6
				考克氏菌属 *Kocuria*	1
			皮杆菌科 *Dermabacteraceae*	短杆菌属 *Brachybacterium*	2
		分枝杆菌目 Mycobacteriales	棒状杆菌科 *Corynebacteriaceae*	棒状杆菌属 *Corynebacterium*	3

（续表 1）

样品来源	纲	目	科	属	菌种数
设备（F）	芽孢杆菌纲 Bacilli	芽孢杆菌目 Bacillales	葡萄球菌科 *Staphylococcaceae*	葡萄球菌属 *Staphylococcus*	3
			芽孢杆菌科 *Bacillaceae*	芽孢杆菌属 *Bacillus*	1
				嗜碱芽孢杆菌属	1
	放线菌纲 Actinomycetes	微球菌目 Micrococcales	微球菌科 *Micrococcaceae*	微球菌属 *Micrococcus*	1
				考克氏菌属 *Kocuria*	1
			皮生球菌科 *Dermacoccaceae*	坐皮肤球菌属 *Kytococcus*	1
			诺卡氏菌科 *Nocardiaceae*	戈登氏菌属 *Gordonia*	1
	黄杆菌纲 Flavobacteria	黄杆菌目 Flavobacteriales	黄杆菌科 *Flavobacteriaceae*	伊丽莎白菌属 *Elizabethkingia*	1
	γ- 变形菌纲 Gammaproteobacteria	假单胞菌目 Pseudomonadales	莫拉菌科 *Moraxellaceae*	莫拉菌属 *Moraxella*	1
水（W）	α- 变形菌纲 Alphaproteobacteria	根瘤菌目 Rhizobiales	慢生根瘤菌科 *Bradyrhizobiaceae*	红假单胞菌属 *Rhodopseudomonas*	2
			根瘤菌科 *Rhizobiaceae*	土壤杆菌属 *Agrobacterium*	2
		生丝微菌目 Hyphomicrobiales	甲基杆菌科 *Methylobacteriaceae*	甲基红色杆菌属 *Methylorubrum*	3
	γ- 变形菌纲 Gammaproteobacteria	黄色单胞菌目 Xanthomonadales	黄单胞菌科 *Xanthomonadaceae*	寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*	4
		假单胞菌目 Pseudomonadales	莫拉菌科 *Moraxellaceae*	不动杆菌属 *Acinetobacter*	2
	β- 变形菌纲 Betaproteobacteria	伯克菌目 Burkholderiales	丛毛单胞菌科 *Comamonadaceae*	食酸菌属 *Acidovorax*	1
				丛毛单胞菌属 *Comamonas*	1
			伯克氏菌科 *Burkholderiaceae*	罗尔斯通氏菌属 *Ralstonia*	1
		立克次体目 Rickettsiales	丛毛单胞菌科 *Comamonadaceae*	戴尔福特菌属 *Delftia*	3
	芽孢杆菌纲 Bacilli	芽孢杆菌目 Bacillales	类芽孢杆菌科 *Paenibacillaceae*	类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*	1

对菌株的 16S 序列进行多序列比对，Gap Open 设置为 －400，聚类方法为非加权组平均法（unweighted pair-group method with arithmetic means，UPGMA）。应用邻接法构建进化树，系统发育检验设置为 Bootstrap 方法，其数值设置为 500，替代模型设置为 K-2 模式。结果如图 2 ～ 5 所示。

系统发育树的节点间距离反映了各菌株间的遗传亲缘关系，距离越近表示进化关系越接近。本研究构建的系统发育树显示，空调系统样本中 42 株菌株可划分为 3 个主要分支，主要聚集于葡萄球菌属、微球菌属、假单胞菌属和莫拉菌属。人员样本中 25 株菌株主要集中于 2 个分支，优势菌属包括芽孢杆菌属、微球菌属和葡萄球菌属。设备样本中 11 株菌株分为 2 个主要分支，主要为葡萄球菌属。相比之下，水系统样本中 22 株菌株同样聚为 3 个主要分支，但各菌属分布较为分散，未呈现明显的优势菌属聚集特征，提示其微生物组成具有较强的多样性和独立性。

2.5 跨环境同源菌株分析

为进一步探索不同环境中微生物群落的分布特征及其潜在传播途径，通过维恩图分析了菌种的跨环境分布情况（图 6）。跨环境分布的菌种涵盖芽孢杆菌纲（Bacilli）、放线菌纲（Actinomycetes）和 γ- 变形菌纲（Gammaproteobacteria），共有 9 个菌种在至少 2 个环境中被检测到，具体信息如表 2 所示。

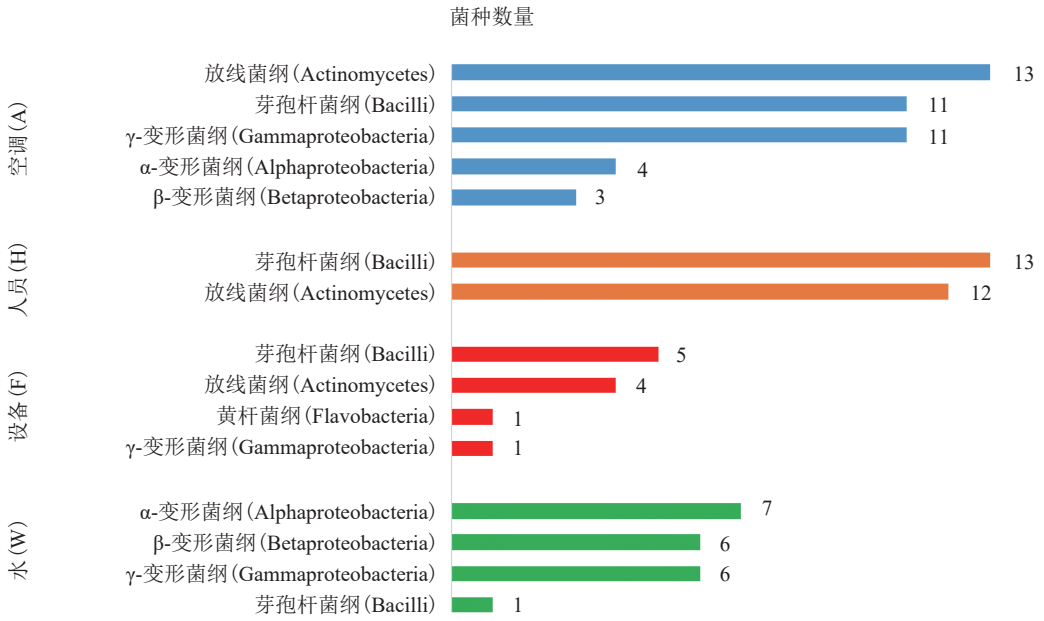


图 1 各来源样本菌种在纲水平上的统计分布

Fig.1 Statistical Distribution of Microbial Species at Class Level Across Sample Sources

表 2 跨环境分布菌种

Tab.2 Cross-environmentally Distributed Bacterial Species

纲	种	空调	设备	人员
芽孢杆菌纲 Bacilli	表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis*	+	+	+
放线菌纲 Actinomycetes	沼泽考克菌 *Kocuria palustris*	+	+	+
芽孢杆菌纲 Bacilli	溶血葡萄球菌 *Staphylococcus haemolyticus*	+	-	+
芽孢杆菌纲 Bacilli	近芽孢杆菌 *Peribacillus frigoritolerans*	+	-	+
放线菌纲 Actinomycetes	藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*	+	-	+
芽孢杆菌纲 Bacilli	头状葡萄球菌 *Staphylococcus capitis*	+	+	-
γ- 变形菌纲 Gammaproteobacteria	腔隙莫拉菌 *Moraxella osloensis*	+	+	-
芽孢杆菌纲 Bacilli	高地芽孢杆菌 *Bacillus altitudinis*	-	+	+
放线菌纲 Actinomycetes	南极微球菌 *Micrococcus antarcticus*	-	+	+

3 讨论

3.1 基于菌种鉴定结果消毒针对性建议

本研究通过 16S rRNA 测序和系统发育分析，揭示了不同环境介质中微生物群落的独特性和共同性。此次检测出的环境介质中的菌种主要属于放线菌纲、芽孢杆菌纲、α-/β-/γ- 变形菌纲这 5 个菌纲。不同环境中的菌种分布也不相同，因此，针对这些关键菌株，建议采取以下针对性消毒措施。

3.1.1 空调系统

制药生产过程使用的空调系统作为洁净区空气处理的核心单元，其滤网微生物负荷直接决定环境空气质量。空调系统中常见芽孢杆菌污染。芽孢杆菌的孢子形态具有极强的环境耐受性，能抵抗干燥、紫外线和部分化学消毒剂，造成持续污染[9]。另外，送风管道内壁的积尘也为放线菌提供了合适的生长基质，并且放线菌以较强的环境适应性和生物膜形成能力而著称[10]。鉴于放线菌纲和芽孢杆菌纲在空调系统中的高丰度，建议加强空调滤网的定期更换和深度清洁，采用紫外线或臭氧处理以破坏生物膜结构，并结合高效空气过滤器，可减少气溶胶化菌株的传播[11]。

3.1.2 设备表面

直接接触药品的灌装头、传送带等生产设备表面的微生物控制水平直接影响产品无菌保证水

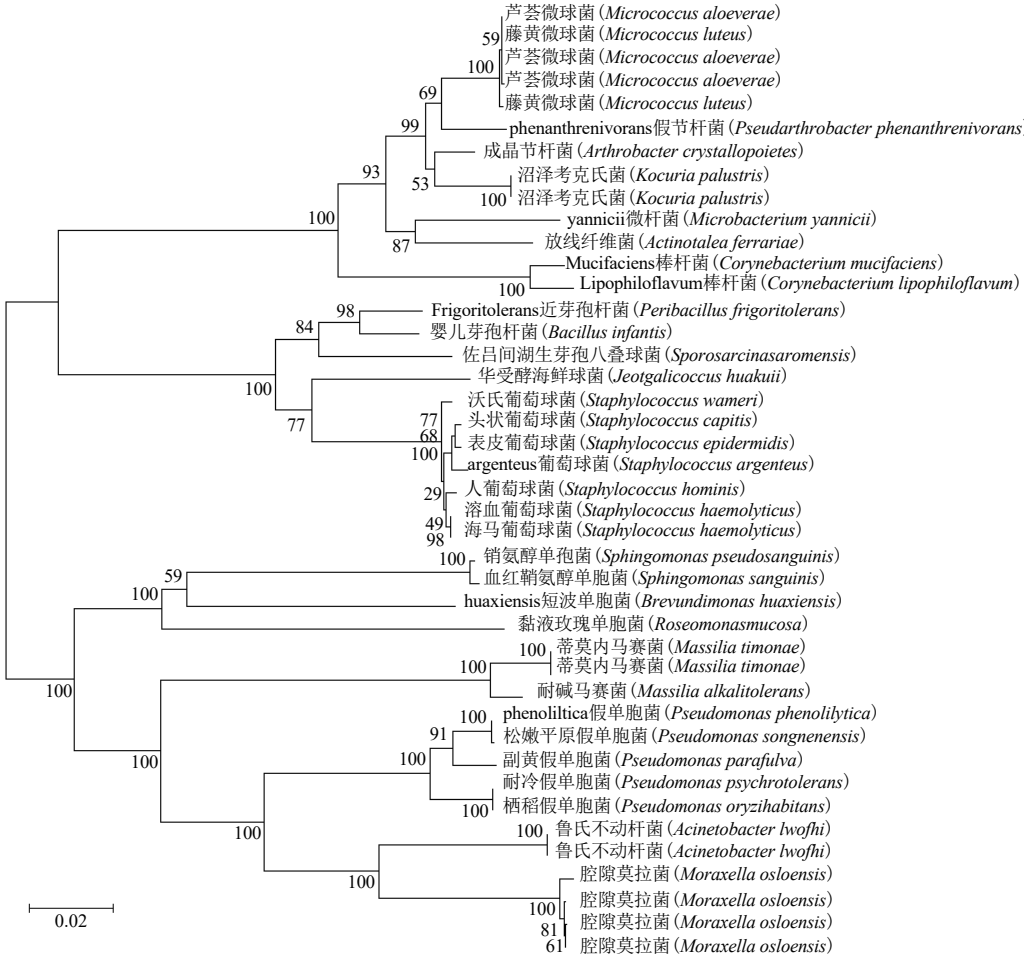


图 2　空调系统来源样本菌种系统发育树

Fig.2　Phylogenetic Tree of Strains Collect from Air Conditioning System

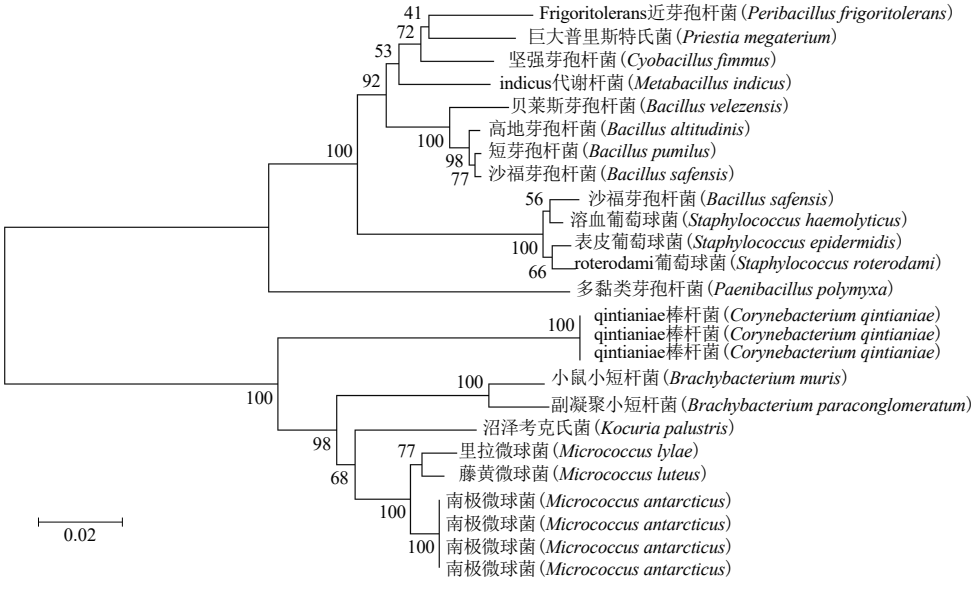


图 3　人员工作服来源样本菌种系统发育树

Fig.3　Phylogenetic Tree of Strains Collected from Personnel Workwear

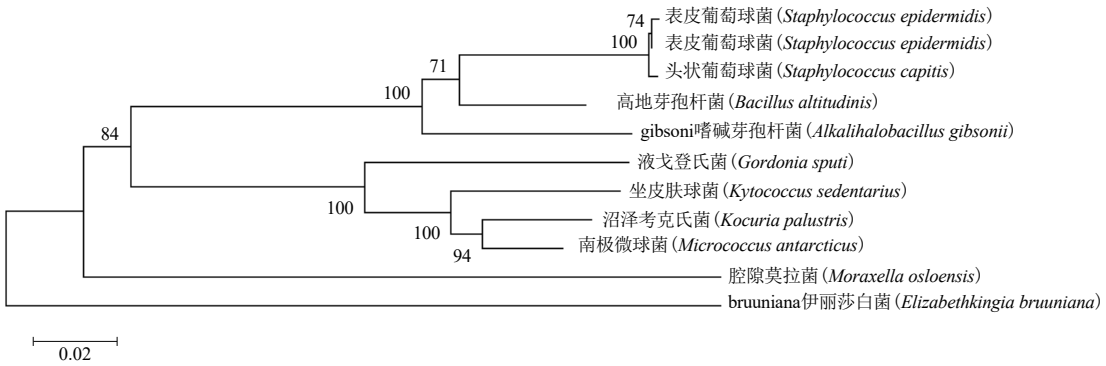


图 4 设备表面来源样本菌种系统发育树

Fig.4 Phylogenetic Tree of Strain Collected from Equipment Surfaces

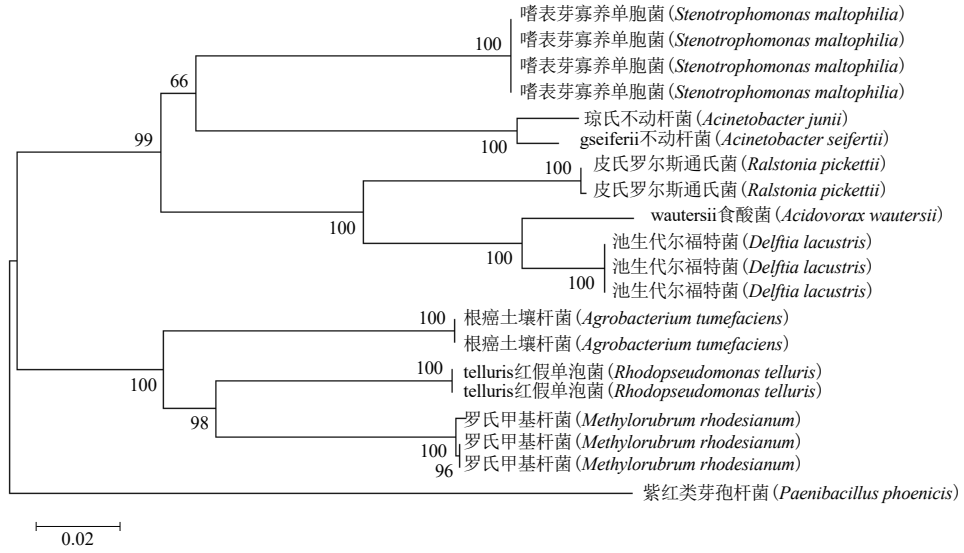


图 5 水系统来源样本菌种系统发育树

Fig.5 Phylogenetic Tree of Strains Collected from Water System

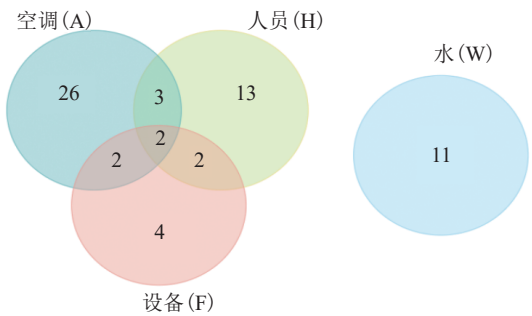


图 6 跨环境同源菌株维恩图

Fig.6 Venn Diagram of Shared Strains Across Environments

平。设备接触面残留的糖类、蛋白质等有机物可以为芽孢杆菌提供营养，而当不锈钢表面形成生物膜后，会造成常规酒精擦拭和季铵盐消毒剂效果有限[12]。建议采用汽化过氧化氢（vaporized hydrogen peroxide，VHP）消毒或高温高压蒸汽处理，针对芽孢和生物膜进行深度消毒，同时优化设备表面的材料选择（如采用抗菌涂层），以减少菌株附着[13]。

3.1.3 人员管理

生产人员作为最大的移动污染源，人员活动可使洁净室微生物浓度瞬时增加 3 至 5 个数量级，造成空调系统、生产设备以及产品污染[14]。人员样本中芽孢杆菌纲与放线菌纲的共优势现象反映了人体微生物与生产环境的交互作用。芽孢杆菌纲的芽孢形成菌可通过工作服纤维孔隙持续释放；而放线菌纲中的棒状杆菌属作为人体皮肤常驻菌群，其丰度

与人员驻留时间呈正相关[15]。建议加强人员洁净服的更换频率，优化更衣室空气净化系统，并在关键操作区域设置空气淋浴装置，以减少皮屑和微生物的携带。

3.1.4 水系统

制药用水系统作为药品生产全过程的重要环节，其微生物指标是各国药典的强制监控项目。在水循环系统中，α-、β- 和 γ- 变形菌纲占据主导地位，其生物膜形成能力和抗氯性不容忽视[16]。建议优化水系统处理工艺和消毒措施，定期加强系统维护，并使用抗菌材料（如铜离子涂层），以抑制生物膜形成。

3.2 菌种丰度分布与风险预警

本研究结果显示，尽管不同环境中菌种的丰度分布存在显著差异，但芽孢杆菌纲和放线菌纲在空调、设备、人员中都占较高的比例。芽孢杆菌纲在人员（52.0%）、设备（45.45%）和空调（26.19%）样本中的占比较高，且芽孢形成能力使其在环境胁迫下仍能存活并传播。建议将芽孢杆菌纲作为首要预警对象，定期监测其丰度变化，尤其要监控人员活动频繁的区域和设备表面。放线菌纲在空调系统（30.95%）、人员（48.00%）和设备（36.36%）样本中丰度较高，其生物膜形成能力可能导致持续污染。建议重点监测空调滤网和设备表面的放线菌纲丰度，结合紫外线和 VHP 灭菌处理以破坏生物膜结构[11]。

此外，水系统中 α-、β- 和 γ- 变形菌纲占据主导地位，并且与其他 3 种环境（空调系统、设备、人员）之间没有共有菌株。这表明水系统中的微生物群落具有相对独立性。这可能与其独特的环境条件（低营养、水流动态、持续消毒）以及微生物的生态适应性有关[17]。水系统中 α- 变形菌纲（35.00%）、β- 变形菌纲（30.00%）和 γ- 变形菌纲（30.00%）的共存，提示研究者应关注水系统的生态复杂性和相对独立性，同时在制药企业环境微生物管理中，应将水系统作为一个独立的单元进行管理和控制。建议企业制定专门针对水系统的微生物控制方案，重点关注水系统特有的优势菌群（如变形菌纲）及其抗性机制，优化水系统的处理工艺和消毒措施，确保水质持续稳定[18]。

3.3 建立工厂菌种库及菌种溯源体系

本研究利用 16S rRNA 测序技术和系统发育分析，解析了洁净环境的微生物群落结构和潜在传播途径。在菌种鉴定基础上，构建了不同来源菌株系统发育树，有助于从进化关系角度深入理解微生物的分布格局。系统发育分析不仅揭示了菌株间的亲缘关系，还可识别出表面分类相同但遗传背景差异较大的菌株，或识别分类不同但在系统发育树上高度聚集的菌群，为判断其是否来源于共同污染源或具有相似生态行为提供依据。相比传统分类学方法，基于 16S 序列相似性的系统聚类分析具备更高分辨力，有助于识别“隐性高风险菌株”及其传播网络。这类分析不仅为污染溯源与传播机制研究提供支持，也为消毒靶点优化和微生物风险控制策略制定提供了数据基础，展现出高通量分子技术在 GMP 环境控制中的广泛应用潜力。未来，结合菌群丰度及时间序列信息，有望实现污染趋势的动态监测与早期预警。

为进一步提升微生物风险防控的精准度和效率，建议企业建立工厂特异性的菌种库和菌种溯源体系[11, 13, 17]。数据库应包含以下方面的信息：①菌种基本信息，如名称、分类、检出地点、检出时间等；②用于快速鉴定菌种的指标，如 16S rRNA 序列、菌种培养特征、菌种培养图片等；③依据微生物的属性，进行消毒剂效果验证，选择针对性消毒剂。

菌种库的构建可基于日常环境监测数据，长期积累和鉴定关键环境菌株，特别是优势菌群和高风险菌群。结合 16S rRNA 测序数据和系统发育分析，可以实现对污染菌株的快速鉴定和溯源。当生产过程中出现微生物超标事件时，可以通过比对污染菌株与菌种库中的已知菌株，快速判断污染来源和潜在传播路径，从而精准定位污染源并采取相应的纠正措施。此外，菌种库还可以用于评估不同消毒剂和清洁程序的有效性，指导优化环境控制策略。菌种溯源体系的建立，将为制药企业构建基于数据的风险管理体系提供有力支撑，实现从被动响应到主动预防的转变。

4 总结

本研究通过 16S rRNA 测序和系统发育分析，

揭示了制药企业空调系统、设备、人员和水系统4种环境中微生物群落的分布特征及其传播途径。空调系统、设备和人员环境中存在显著的共有菌株，涉及芽孢杆菌纲、放线菌纲和γ-变形菌纲，提示其可能通过人员接触、空气流动和设备表面传播；水系统菌株与其他环境无交叉分布，显示其相对独立性。基于菌种分布特征，可针对不同环境设计针对性的消杀方法。本研究为制药企业提升环境微生物控制水平提供了新的视角和方法，有助于推动行业向更安全、更高效、更智能的微生物风险管理模式转型，最终保障药品质量安全和患者用药安全。

参考文献：

[1] PATEL R, VHORA A, JAIN D, *et al*. A retrospective regulatory analysis of FDA recalls carried out by pharmaceutical companies from 2012 to 2023 [J]. *Drug Discov Today*, 2024, **29**(6): 103993.

[2] 郑小玲, 王知坚, 李 珏, 等. 多种测序技术在药品检测环境微生物鉴定分析中的应用研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, **36**(1): 58-65.

[3] MIAO J J, YIN Z D, YANG Y Q, *et al*. Investigation of the microbial community structure and diversity in the environment surrounding a veterinary antibiotic production factory [J]. *RSC Adv*, 2022, **12**(2): 1021-1027.

[4] 张聪聪, 毛腾霄, 程 龙. 三家无菌制药企业洁净车间环境微生物的鉴定和群落分析 [J]. 中国医药工业杂志, 2021, **52**(6): 828-835.

[5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 医药工业洁净室（区）浮游菌的测试方法: GB/T 16293—2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法: GB/T 16294—2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[7] 中华人民共和国住房和城乡建设部, 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 洁净室施工及验收规范: GB 50591—2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[8] MONCIARDINI P, SOSIO M, CAVALETTI L, *et al*. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, **42**(3): 419-429.

[9] AL-ABDALALL A H, AL-DAKHEEL S A, AL-ABKARI H A. Impact of air-conditioning filters on microbial growth and indoor air pollution [M]//MOROSUK T, SULTAN M. Low-temperature Technologies. London: IntechOpen, 2020.

[10] 徐荣荣. 空调风系统积尘伴生微生物种类鉴定与热湿响应特性研究 [D]. 广州: 仲恺农业工程学院硕士学位论文, 2013.

[11] 王似锦, 余 萌, 王杠杠, 等. 制药企业洁净区环境监控与环境菌库的建设 [J]. 中国医药工业杂志, 2020, **51**(10): 1334-1340.

[12] RATAJCZAK M, KAMINSKA D, DLUGASZEWSKA J, *et al*. Antibiotic resistance, biofilm formation, and presence of genes encoding virulence factors in strains isolated from the pharmaceutical production environment [J]. *Pathogens*, 2021, **10**(2): 130.

[13] 刘绪平, 易路遥, 张文婷, 等. 基于数字PCR技术的药品GMP车间环境微生物定量检测及溯源方法研究 [Z]. 江西省, 江西省药品检验检测研究院, 2019.

[14] WHYTE W, EATON T. Assessment of degree of risk from sources of microbial contamination in cleanrooms; 1: airborne [J]. *Eur J Parenter Pharm Sci*, 2015, **20**: 52-62.

[15] 张平究, 梁 川, 陈 芳, 等. 退耕还湿后土壤细菌群落结构和生物量变化过程 [J]. 生态学报, 2023, **43**(11): 4747-4759.

[16] BROOKE J S. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2012, **25**(1): 2-41.

[17] 孙荣嵘, 徐 晨, 刘 洋, 等. 二代测序用于药品微生物检测洁净区环境菌库的建立 [J]. 中国合理用药探索, 2022, **19**(10): 104-108.

[18] 户美玲, 陈 佩, 严东珍, 等. 建立洁净区微生物数据库与无菌药品GMP生产过程控制的探讨 [J]. 微生物学免疫学进展, 2013, **41**(3): 33-36.