制药用水菌库构建与增幅 ATP 生物发光微生物快检技术的适用性研究

张润利[1,2]，王杠杠[2]，任凤姣[1,2]，王似锦[2]，马仕洪[2*]

（1. 中国药科大学工学院，江苏南京 211198；2. 中国食品药品检定研究院，北京 100050）

摘要：收集不同来源的制药用水样本，通过分离、纯化得到 18 株制药用水系统微生物，并对此 18 株菌进行 16S rDNA 测序法鉴定，分析其生长曲线。结果显示，大部分水系统菌株（除纤维微杆菌属）在 R2A 培养基中生长良好且延滞时间短。在此基础上，该研究成功构建了专属菌库。对于专属菌库中的 18 株菌，增幅 ATP 生物发光快检技术的最低检测浓度范围为 10 ～ 1.0×10^4 cfu/mL；而对于常见水系统中的革兰阴性菌，最低检测浓度范围为 10 ～ 1.0×10^3 cfu/mL。结合菌株特性进行预培养后，大多数试验菌株在对应的预培养体系及预培养时间条件下，检测结果均为“positive”或“overload”。

关键词：制药用水；增幅 ATP 生物发光法；快速微生物检测；环境菌库

中图分类号：O433；Q93-33　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)11-1439-08

引用：张润利，王杠杠，任凤姣，等．制药用水菌库构建与增幅 ATP 生物发光微生物快检技术的适用性研究［J］．中国医药工业杂志，2025, **56**(11): 1439-1446．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.11.010

Establishment of a Microbial Library for Pharmaceutical Water and Applicability of the Amplified ATP Bioluminescence-based Rapid Microbial Detection Technology

ZHANG Runli[1,2], WANG Ganggang[2], REN Fengjiao[1,2], WANG Sijin[2], MA Shihong[2*]

(*1. School of Engineering,China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050*)

ABSTRACT: Pharmaceutical water samples from various sources were collected, and 18 strains of microorganisms were isolated and purified from the samples. These 18 strains were identified by 16S rDNA sequencing, and their growth curves were analyzed. The results showed that most of the strains from pharmaceutical water system (except *Cellulosimicrobium*) grew well in R2A medium with a short lag phase, and a specialized microbial bank was successfully constructed. For the 18 strains in this specialized microbial bank, the minimum detection concentration range of the amplified ATP bioluminescence-based rapid detection technology was 10 − 1.0×10^4 cfu/mL, while for common Gram-negative bacteria in water systems, the range was 10 − 1.0×10^3 cfu/mL. After pre-culture based on the characteristics of the strains, most test strains showed “positive” or “overload” results under the corresponding pre-culture system and time conditions.

Key Words: water for pharmaceutical use; amplified ATP bioluminescence method; rapid microbiological detection; environmental microbial library

制药用水在药品生产过程中具有关键作用，既作为原辅料用于药品生产，也用于人员清洁及设备和内包材的清洗，因此确保制药用水的质量安全至关重要。微生物监测是制药用水质量控制的一项重要指标。制药用水系统中的主要污染微生物类群为革兰阴性菌，少数情况下可能存在芽孢杆菌和真菌[1]。这些微生物具有寡营养、嗜低温、生长缓慢、耐受性强、菌株类型复杂且易形成生物膜等特点，部分微生物甚至能穿透滤膜[2—3]，这给制药用水系统的微生物监测和控制带来巨大挑战。

传统的制药用水微生物检测方法依赖于微生物在固体培养基（如 R2A 培养基）上的自然生长信号，

收稿日期：2025-04-16

作者简介：张润利，硕士研究生，专业方向：药品微生物检验与控制。

通信作者：马仕洪，主任药师，硕士生导师，从事药品微生物检验与控制研究。

培养时间至少需要 5 d，导致检验结果的时效性较差，问题的发现和处理具有明显滞后性[4—5]。与传统方法相比，快速微生物检测方法（rapid microbiological method，RMM），尤其是在线和近在线技术，能更快速、更准确地监测水系统的运行状态，为及时发现异常并采取纠正措施提供有力支持[6—7]。ChP 2020 年版将现有的快速微生物检验技术大致分为三类：基于微生物生长信号的方法、直接测定微生物的方法和基于微生物细胞组分的方法。其中，腺苷三磷酸（adenosine triphosphate，ATP）生物发光技术属于基于微生物生长信号的方法，其原理是通过荧光素酶和 Mg^{2+} 催化 ATP 与荧光素和氧气的反应，生成氧化荧光素并释放出光子，产生荧光信号，通过检测活微生物中普遍存在的 ATP，间接反映样品中的活菌数量[8—9]。该方法具有快速、灵敏、广谱等优点，但也存在半衰期短、提取 ATP 效率有限、荧光素反应稳定性差等缺点，限制了生物发光检测的应用范围[10]。

增幅 ATP 生物发光微生物快检技术通过加入过量的腺苷二磷酸（adenosine diphosphate，ADP），利用微生物体内的腺苷酸激酶（adenylate kinase，AK）将 ADP 转化为 ATP，从而提高检测灵敏度，放大生物发光信号，缩短检测时间[11]。该方法使用液体培养基对样品进行预培养后上机检测，通过测量荧光发光强度（相对光单位，relative light unit，RLU）反映样品中的 ATP 含量，进而判断是否有微生物生长，实现对制药用水中微生物污染的快速定性或半定量分析[12—13]。

目前，针对 RMM 的验证研究大多局限于药典规定的标准菌株；而这些菌株在制药用水系统的实际检测应用中可能缺乏足够的代表性。鉴于制药用水系统污染微生物类群的复杂性，验证新方法对于水系统菌株的检出能力显得尤为重要。因此，本研究初步构建了针对国内制药用水系统的专属环境菌库，并使用典型菌对增幅 ATP 生物发光微生物快检技术进行挑战研究，以评价其用于制药用水微生物监测的适用性。

1　仪器与试药

Celsis Advance Ⅱ型微生物快速检测系统（美国 Charles River 公司）；BioTek LogPhase 600 型全自动微生物监测仪（美国 Agilent 公司）；QX200 Auto DG 型微滴式数字 PCR 系统（美国 BIO-RAD 公司）；Quintix 224-1CN 型电子天平（德国 Sartorius 公司）。

胰酪大豆胨液体培养基（trypticase soy broth，TSB，上海诺狄生物科技有限公司，批号 F3AB82445）；胰酪大豆胨琼脂培养基（trypticase soy agar，TSA，上海诺狄生物科技有限公司，批号 4328240126-2N）；R2A 琼脂培养基（美国 BD 公司，批号 0132144）；R2A 液体培养基（海博生物技术有限公司，批号 20230704）；0.9%氯化钠注射液［华夏生生药业（北京）有限公司，批号 20230607］；Celsis AMPiscreen Pharma 试剂盒（批号 062303-T400）、Celsis Daily Wash & Rinse 试剂（批号 052301-142N）、Celsis ATP Positive Control 试剂（批号 052301-1483）均购于美国 Charles River 公司；PrepGEM Bacteria PBA0100 试剂盒（英国 MicroGEM 公司，批号 PBA0100P0714A）。

制药用水来源于以下 8 家国内制药企业，名称缩写为 STS、AH、PQ、JX、DC、PD、YB、EB，从中分离的菌株编号以“制药企业名称缩写 - 序号”表示。

2　方法与结果

2.1　菌库构建

2.1.1　水系统菌株的分离鉴定

按 ChP 2020 年版纯化水微生物限度要求，对 8 家制药企业制药用水进行微生物限度检查，将检出的微生物进行分离和纯化，并用甘油冻存管进行菌种保藏。将分离出的菌株划线至 TSA 平板和 R2A 平板，于 33 ℃培养 1 ～ 7 d，获得新鲜的纯培养物，备用。使用细菌基因组快速提取试剂盒提取待测菌株的基因组核酸，设置灭菌纯化水作为核酸提取及扩增的阴性对照。针对细菌核糖体序列进行特异性扩增，细菌目标片段为 16S rDNA。扩增引物、扩增条件如表 1 所示。

扩增产物的检测及测序工作委托北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。扩增产物经双向测序，对峰图结果进行质量核查，双向拼接为待测菌株的核糖体序列。将所得核糖体序列与经验证的权威数据库（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）进行比对，获得待测微生物的核糖体分析结果，鉴定至属

表 1 16S rDNA 测序的扩增引物及反应条件

Tab.1 Amplification Primers and Reaction Conditions of 16S rDNA Sequencing

项目	条件
扩增引物	27f：5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ 1492r：5′-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′
扩增条件	预变性：95 ℃，4 min 扩增循环：95 ℃，30 s；50 ℃，45 s；72 ℃，90 s；35 个循环 延伸：72 ℃，5 min

水平。制药用水分离微生物的核糖体序列分析结果如表 2 所示。

本研究从纯化水、注射用水出水口共分离得到 18 株微生物，其中 12 株为革兰阴性菌，包括鞘氨醇单胞菌属、罗尔斯通菌属、不动杆菌属、伯克霍尔德菌属、叶瘤杆菌属、甲基杆菌属、寡养单胞菌属、嗜酸菌属、短波单胞菌属、布鲁杆菌属、草螺菌属、莫拉菌属，6 株为革兰阳性菌，包括微杆菌属、葡萄球菌属芽孢杆菌属、纤维微杆菌属、短杆菌属、微小杆菌属。

2.1.2 水系统菌株生长特性研究

通过生长曲线测定及参数分析的方式，比较分离所得的各菌株在 R2A 液体培养基、TSB、1/10 TSB 中的生长特性，具体方法如下。

取制药用水分离菌株冻存管，恢复至室温，取菌液 100 μL 接入 TSB 或 1/10 TSB 10 mL 中，于 30 ～ 35 ℃培养至菌株生长平台期；用 0.9%无菌氯化钠溶液进行 10 倍梯度稀释，作为工作菌液备用。

取 1.0×10^3 cfu/mL 的工作菌液 100 μL，加入待测培养基 10 mL，混匀，使混匀后培养基中的菌浓度为 10 cfu/mL。将混匀后的样品加至 96 微孔板中，每孔 200 μL，设置 3 个平行。使用全自动微生物监测仪测定生长曲线，工作参数设置为：培养温度 33 ℃，培养时间 72 h，每 20 min 测定 1 次 600 nm 处的 OD 值（OD_{600}），每次测定前振摇 15 s。

设置每 8 h 为 1 个检测时间节点，共 8 个检测时间节点，即 8、16、24、32、40、48、56、64 h。每个时间节点覆盖其前后 4 h 的时间区间，得到制药用水系统分离菌株在不同培养体系中的延滞时间［延滞时间是指最大生长速率对应的线性回归线与首次测量所得 OD_{600} 值的交点处的时间坐标，使用 BioTek Gen5 软件（版本 3.12）计算得到］。水系统菌株在 3 种培养体系中的生长曲线对比结果如图 1 所示。

表 2 制药用水中分离所得微生物的 16S rDNA 测序分析结果

Tab.2 Results of 16S rDNA Sequence Analysis of Microorganisms Isolated from Pharmaceutical Water

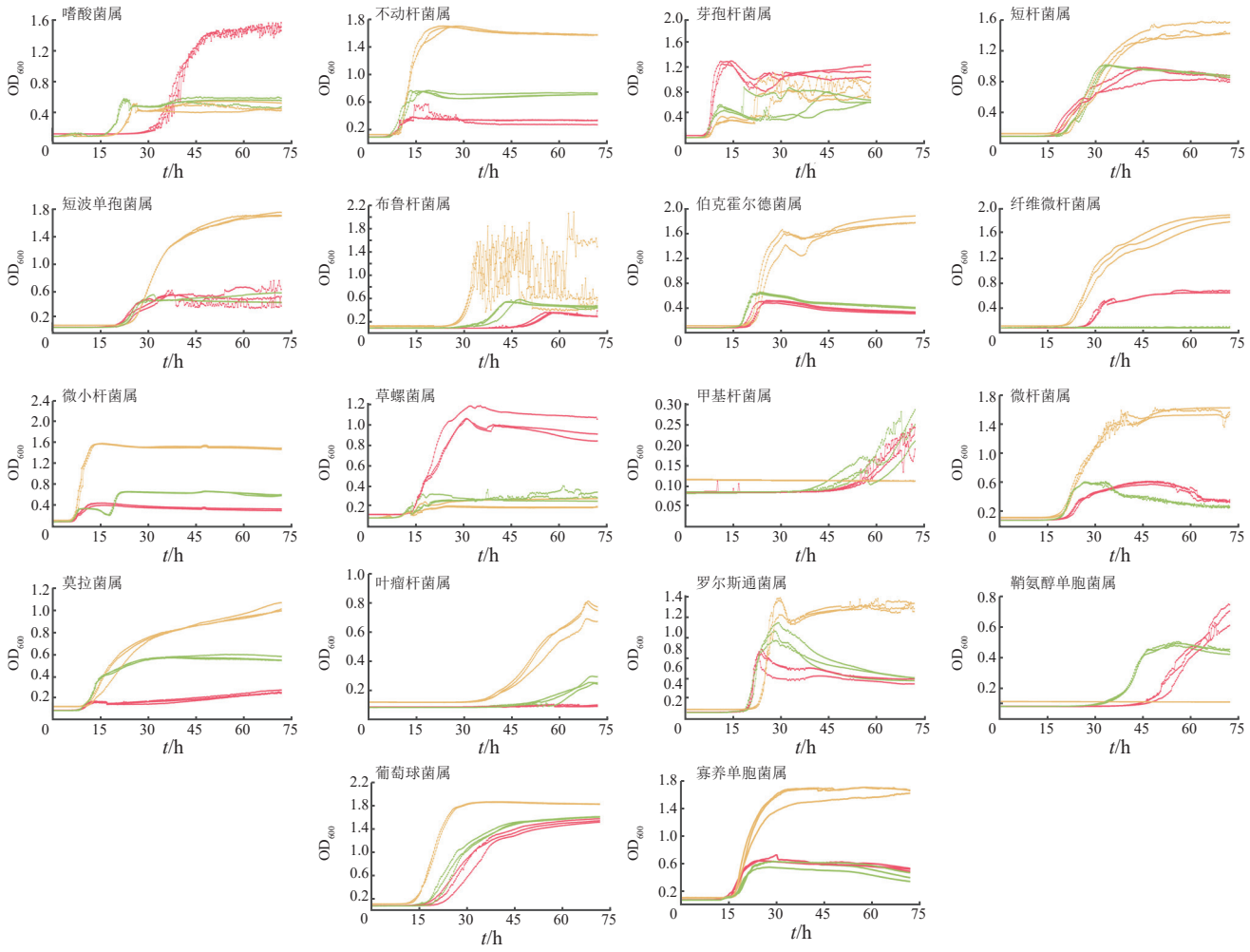
菌株编号	来源	16S rDNA 序列分析结果	菌属
EB-1	纯化水	刺状鞘氨醇单胞菌（*Sphingomonas echinoides*）	鞘氨醇单胞菌属（*Sphingomonas*）
EB-2	纯化水	*Ralstonia insidiosa*	罗尔斯通菌属（*Ralstonia*）
YB-1	水系统	*Acinetobacter nosocomialis/seifertii*	不动杆菌属（*Acinetobacter*）
YB-2	水系统	*Burkholderia cenocepacia/contaminans/aenigmatica/territorii/orbicola/cepacia/anthina/arboris/seminalis/puraquae/diffusa/metallica/lata/vietnamiensis/ambifaria/latens/pyrrocinia/stabilis/ubonensis*	伯克霍尔德菌属（*Burkholderia*）
PD-1	纯化水	紫金牛叶杆菌（*Phyllobacterium myrsinacearum*）	叶瘤杆菌属（*Phyllobacterium*）
PQ-1	纯化水	*Microbacterium marinum*	微杆菌属（*Microbacterium*）
JX-1	纯化水	*Staphylococcus cohnii subsp. Cohnii/ureilyticus/arlettae/nepalensis*	葡萄球菌属（*Staphylococcus*）
STS-1	水系统	*Methylobacterium komagatae*	甲基杆菌属（*Methylobacterium*）
STS-2	水系统	*Stenotrophomonas pavanii/geniculate/maltophilia/lactitubi/hibiscicola*	寡养单胞菌属（*Stenotrophomonas*）
PQ-2	纯化水	*Acidovorax soli*	嗜酸菌属（*Acidovorax*）
DC-1	纯化水	*Bacillus cereus/proteolyticus/albus/anthracis*	芽孢杆菌属（*Bacillus*）
DC-2	水系统	*Cellulosimicrobium funkei/cellulans/composti*	纤维微杆菌属（*Cellulosimicrobium*）
AH-1	水系统	*Brevibacterium sanguinis/celere*	短杆菌属（*Brevibacterium*）
PQ-3	纯化水	*Brevundimonas aurantiaca*	短波单胞菌属（*Brevundimonas*）
PD-3	水系统	*Brucella cytisi/anthropic/tritici*	布鲁杆菌属（*Brucella*）
STS-3	水系统	*Herbaspirillum huttiense subsp/Putei/aquaticum/camelliae*	草螺菌属（*Herbaspirillum*）
AH-2	注射用水	*Exiguobacterium acetylicum/indicum/enclense*	微小杆菌属（*Exiguobacterium*）
AH-3	水系统	奥斯陆莫拉菌（*Moraxella osloensis*）	莫拉菌属（*Moraxella*）

表 3 所列为 18 株菌在各体系中的延滞时间，以及各试验菌株确定的预培养体系、预培养时间节点。其中，鞘氨醇单胞菌属、罗尔斯通菌属、伯克霍尔德菌属、微杆菌属、嗜酸菌属、芽孢杆菌属、布鲁杆菌属、草螺菌属在 R2A 液体培养基中的生长曲线延滞时间短；不动杆菌属、甲基杆菌属、寡养单胞菌属、短波单胞菌属、莫拉菌属在 R2A 和 1/10 TSB 液体培养基中的生长曲线延滞时间短且接近；短杆菌属和微小杆菌属在 1/10 TSB 液体培养基中的生长曲线延滞时间短，与 R2A 液体培养基中的生长曲线延滞时间相差较大；叶瘤杆菌属、葡萄球菌属在 TSB 液体培养基中的生长曲线延滞时间短，与 R2A 液体培养基中的生长曲线延滞时间相差较大；纤维微杆菌属在 TSB 液体培养基中的生长曲线延滞时间短，在 R2A 液体培养基中未检测到生长。综上所述，大部分水系统菌株在 R2A 培养基中生长良好且延滞时间短。考虑到实际检测时应尽量选择同一种预培养体系进行预培养，除纤维微杆菌属选择以 TSB 液体培养基作为预培养体系外，其余菌株均以延滞时间短的培养体系以及 R2A 液体培养基作为预培养体系。

2.2　增幅 ATP 生物发光技术的适用性研究

2.2.1　工作菌液制备

按“**2.1.2**”项下方法进行菌株复苏。用 0.9％



1/10 TSB 体系；TSB 体系；R2A 体系。

图 1　制药用水系统中分离所得菌株在 3 种培养体系中的生长曲线图

Fig.1　Growth Curves of the Strains Isolated from Pharmaceutical Water System in Three Culture Systems

表 3 制药用水系统中分离所得微生物的延滞时间和预培养体系

Tab.3 Lag Phase Results of the Strains Isolated from Pharmaceutical Water System and Their Pre-cultivation Systems

菌株编号	属	延滞时间 [1)]/h			预培养体系	
		1/10 TSB 体系	TSB 体系	R2A 体系	培养基	预培养时间 /h
EB-1	鞘氨醇单胞菌属	51.44±2.98	—	37.66±0.32	R2A	40
EB-2	罗尔斯通菌属	19.15±0.17	23.12±0.09	19.14±0.47	R2A	16
YB-1	不动杆菌属	7.49±0.82	10.06±0.10	8.33±0.91	R2A	8
YB-2	伯克霍尔德菌属	19.05±0.93	21.00±0.57	16.75±0.11	R2A	16
PD-1	叶瘤杆菌属	—	43.97±2.28	55.88±3.45	TSB，R2A	40
PQ-1	微杆菌属	20.56±0.50	19.46±0.37	18.66±0.15	R2A	16
JX-1	葡萄球菌属	21.69±2.34	14.78±0.16	18.80±1.51	TSB，R2A	16
STS-1	甲基杆菌属	54.21±0.06	—	57.96±3.42	R2A	56
STS-2	寡养单胞菌属	14.95±0.49	16.68±0.44	16.42±0.45	R2A	16
PQ-2	嗜酸菌属	34.75±0.93	20.93±0.04	17.82±0.07	R2A	16
DC-1	芽孢杆菌属	5.17±0.31	16.21±0.35	4.44±0.01	R2A	8
DC-2	纤维微杆菌属	27.13±0.48	22.19±0.58	—	TSB	24
AH-1	短杆菌属	17.73±1.50	22.83±1.20	22.48±0.72	R2A，1/10 TSB	16
PQ-3	短波单胞菌属	20.98±0.80	25.72±0.06	22.17±0.46	R2A	24
PD-3	布鲁杆菌属	48.84±1.07	36.94±10.19	36.40±1.77	R2A	40
STS-3	草螺菌属	14.06±0.68	11.34±1.73	10.37±0.83	R2A	8
AH-2	微小杆菌属	6.23±0.20	6.83±0.29	16.66±0.22	R2A，1/10 TSB	8
AH-3	莫拉菌属	8.21±0.27	11.76±0.62	9.97±0.10	R2A	8

注：[1)] 所列参数值是基于 3 次重复试验的均值 ±SD，“—”表示未检测到生长。

无菌氯化钠溶液进行 10 倍梯度稀释，作为工作菌液备用。

2.2.2 增幅 ATP 生物发光快检技术最低检测浓度探索

取菌浓度分别为 1.0×10^0、1.0×10^1、1.0×10^2、1.0×10^3、1.0×10^4、1.0×10^5 cfu/mL 的工作菌液进行最低检测浓度探索。

将 Celsis AMPiscreen Pharma 试剂盒从 -4 ℃冰箱中取出，放置至室温。其中，ADP 底物试剂 Celsis LuminAMP™、细胞裂解剂 Celsis LuminEX® 可以直接使用，荧光素酶试剂 Celsis LuminATE® 用附带的缓冲液简单复溶后使用。将 ATP 阳性对照标品 Celsis ATP Positive Control 从 -20 ℃冰箱中取出，放置至室温。

按以下方法设置 3 组。①试验组：按菌浓度由低到高排序，分别取各工作菌液 50 μL，移至测试管中，设置 2 个平行；②阴性对照组：取 0.9%无菌氯化钠溶液 50 μL，移至测试管中，设置 2 个平行；③ATP 阳性对照组：取 ATP 阳性对照标品 50 μL，移至测试管中，设置 2 个平行。

在进行样品检测前需进行日常对照测试。在仪器中分别放入 2 支空试管作为仪器空白对照，2 支空试管作为试剂空白对照，以及 2 支 ATP 阳性对照试管。关闭舱盖后按 Celsis 微生物快速检测系统的内置方法设置。测试结束后，同时满足仪器空白结果 < 100 RLU，试剂空白结果 <1 000 RLU，ATP 阳性对照结果 >50 000 RLU，才能继续测试。日常对照通过后，将 Celsis LuminAMP™、Celsis LuminEX® 和 Celsis LuminATE® 3 种试剂连接至 Celsis 微生物快速检测系统的对应试剂放置位置，启动 Celsis 微生物快速检测系统，测得光输出信号，然后以相对荧光强度（RLU）显示结果。

同步取各工作菌液 50 μL 于 R2A 琼脂培养基上涂布，于 30 ～ 35 ℃培养至传统培养时间后计数，设置 2 个平行。

设置阴性对照组 RLU 结果为基准 RLU 值。随后将各试验组 RLU 结果与基准 RLU 值进行比较，若 RLU 结果 >3 倍基准 RLU 值，则将样品结果判定为“positive（阳性）”或“overload（超载）”；若 RLU 结果 <3 倍基准 RLU 值，则将样品结果判定为“negative（阴性）”。各试验菌株经增幅 ATP 生物发光快检技术检测，最低检测浓度结果如表 4 所示。

结果显示，18 株菌的最低检测浓度范围为

1.0×10^1 ～ 1.0×10^4 cfu/mL，不同菌株之间存在显著差异。革兰阳性菌中，芽孢杆菌属的最低检测浓度为 1.0×10^1 cfu/mL，微小杆菌属为 1.0×10^2 cfu/mL，而其余 4 株革兰阳性菌的最低检测浓度均为 1.0×10^4 cfu/mL。革兰阴性菌中，叶瘤杆菌属、寡养单胞菌属和布鲁杆菌属的最低检测浓度为 1.0×10^3 cfu/mL，其余 9 株常见水系统革兰阴性菌的最低检测浓度为 1.0×10^1 ～ 1.0×10^2 cfu/mL。

试验过程中观察到，部分菌株（如芽孢杆菌属）在稀释时易发生团聚，难以均匀分布于稀释液中，这可能影响其最低检测浓度。RLU 数值与各菌株菌液浓度呈正相关，菌液浓度越高，固定检测体积下的菌数越多，产生的 ATP 也越多。部分水系统菌株的最低检测浓度较高，直接检测的灵敏度可能无法满足要求，需根据菌株生长特性，设置适当的预培养时间，以提高检测灵敏度并确保检测结果的准确性。

2.2.3　增幅 ATP 生物发光快检技术的适用性验证

按以下方法设置 4 组。①试验组：取 1.0×10^1 cfu/mL 的工作菌液 1 mL，接种入“**2.2.1.2**”项下各菌株考察后的最适预培养体系 100 mL 中，于 30 ～ 35 ℃培养至预培养时间节点；②阳性对照组：同步取 1.0×10^1 cfu/mL 的工作菌液 1 mL，于 R2A 琼脂培养基上涂布，于 30 ～ 35 ℃培养至药典传统方法培养时间后计数，设置 2 个平行；③阴性对照组：同时设置各菌株相应培养体系 100 mL，于 30 ～ 35 ℃培养相同时间；④ ATP 阳性对照组：取 ATP 阳性对照标品 50 μL，移入测试管中，设置 2 个平行。试剂配制方法同“**2.2.2**”项。

预培养结束后，分别取阴性对照组和各试验组 50 μL 移入测试管中，设置 2 个平行。按“**2.2.2**”项下操作方法，启动 Celsis 微生物快速检测系统，测得光输出信号，然后以 RLU 显示结果。若测定结果为“positive”（>3 倍背景 RLU 值）或“overload”，则认为在此预培养体系及预培养时间条件下，增幅 ATP 生物发光快检技术适用。增幅 ATP 生物发光快检技术的适用性验证结果如表 5 所示。

大多数试验菌株使用 R2A 液体培养基作为预培养体系，并在相应的预培养时间节点进行检测时，检测结果均为“positive”或“overload”，表明在 R2A 液体培养基作为预培养体系及相应预培养时间条件下，增幅 ATP 生物发光快检技术适用。

叶瘤杆菌属、葡萄球菌属均可使用 TSB 液体培养基或 R2A 液体培养基作为预培养体系。短杆菌属、微小杆菌属均可使用 1/10 TSB 液体培养基或 R2A 液体培养基作为预培养体系，在相应的预培养时间节

表 4　增幅 ATP 生物发光快检技术最低检测浓度结果 [1)]

Tab.4　Results of Minimum Detection Concentration of ATP Bioluminescence Rapid Detection System

菌株编号	菌属	基准 RLU 值	各工作菌液组的 RLU 值						最低检测浓度 /（cfu·mL^{-1}）
			1.0×10^0 cfu/mL	1.0×10^1 cfu/mL	1.0×10^2 cfu/mL	1.0×10^3 cfu/mL	1.0×10^4 cfu/mL	1.0×10^5 cfu/mL	
EB-1	鞘氨醇单胞菌属	114	110（N）	127（N）	404（P）	3 468（P）	28 368（P）	—	10^2
EB-2	罗尔斯通菌属	260	289（N）	503（N）	2 148（P）	21 275（P）	277 430（P）	2 412 782（P）	10^2
YB-1	不动杆菌属	94	107（N）	701（P）	8 408（P）	3 669（P）	87 187（P）	1 494 201（P）	10^1
YB-2	伯克霍尔德菌属	57	71（N）	75（N）	353（P）	2 644（P）	26 473（P）	330 281（P）	10^2
PD-1	叶瘤杆菌属	86	—	75（N）	80（N）	468（P）	3 825（P）	35 227（P）	10^3
PQ-1	微杆菌属	86	—	88（N）	90（N）	238（N）	318（P）	2 221（P）	10^4
JX-1	葡萄球菌属	279	—	449（N）	300（N）	518（N）	2 515（P）	25 740（P）	10^4
STS-1	甲基杆菌属	68	64（N）	107（N）	219（P）	5 583（P）	25 322（P）	—	10^2
STS-2	寡养单胞菌属	88	—	71（N）	119（N）	818（P）	6 931（P）	68 879（P）	10^3
PQ-2	嗜酸菌属	115	—	221（N）	968（P）	9 575（P）	89 159（P）	824 287（P）	10^2
DC-1	芽孢杆菌属	115	140（N）	1213（P）	12 790（P）	113 564（P）	1 259 335（P）	—	10^1
DC-2	纤维微杆菌属	114	111（N）	118（N）	146（N）	201（N）	966（P）	7 889（P）	10^4
AH-1	短杆菌属	78	93（N）	90（N）	95（N）	173（N）	1 050（P）	8 083（P）	10^4
PQ-3	短波单胞菌属	114	127（N）	193（N）	1 019（P）	8 595（P）	86 427（P）	776 393（P）	10^2
PD-3	布鲁杆菌属	102	93（N）	103（N）	228（N）	2 556（P）	31 422（P）	509 153（P）	10^3
STS-3	草螺菌属	115	—	192（N）	925（P）	6 907（P）	83 490（P）	723 129（P）	10^2
AH-2	微小杆菌属	102	112（N）	223（N）	1 902（P）	16 066（P）	233 613（P）	2 437 255（P）	10^2
AH-3	莫拉菌属	86	81（N）	102（N）	366（P）	2 157（P）	22 400（P）	236 688（P）	10^2

注：[1)] 括号中，“N”表示检测结果为“negative”，“P”表示检测结果为“positive”或“overload”；“—”表示未检出。

表 5 增幅 ATP 生物发光快检技术适用性验证结果

Tab.5 Verification Results of Applicability of Amplified ATP Bioluminescence Rapid Detection System

菌株编号	菌属	预培养体系	预培养时间 /h	结果	RLU[1)]
EB-1	鞘氨醇单胞菌属	R2A	40	positive	5 783
EB-2	罗尔斯通菌属	R2A	16	positive	529 532
YB-1	不动杆菌属	R2A	8	positive	116 920
YB-2	伯克霍尔德菌属	R2A	16	positive	639 325
PD-1	叶瘤杆菌属	R2A	40	positive	227 883
		TSB	40	positive	27 792
PQ-1	微杆菌属	R2A	24	positive	13 790
		R2A	16	negative	935
JX-1	葡萄球菌属	R2A	24	positive	11 958
		TSB	16	positive	36 491
STS-1	甲基杆菌属	R2A	56	positive	355 544
STS-2	寡养单胞菌属	R2A	16	positive	2 415 011
PQ-2	嗜酸菌属	R2A	16	positive	38 082
DC-1	芽孢杆菌属	R2A	8	positive	583 905
DC-2	纤维微杆菌属	TSB	24	negative	2 069
		TSB	32	positive	85 182
AH-1	短杆菌属	R2A	16	negative	784
		R2A	24	positive	6 121
		1/10 TSB	16	negative	291
		1/10 TSB	24	positive	5 197
PQ-3	短波单胞菌属	R2A	24	positive	122 330
PD-3	布鲁杆菌属	R2A	40	overload	99 999 999
STS-3	草螺菌属	R2A	8	negative	469
		R2A	16	positive	523 832
AH-2	微小杆菌属	R2A	8	positive	14 594
		1/10 TSB	8	positive	22 719
AH-3	莫拉菌属	R2A	8	positive	11 719

注：[1)]RLU 值是基于 2 次重复试验的平均值。

点进行检测时，这些菌属的检测结果均为“positive”，表明增幅 ATP 生物发光快检技术适用于这些菌株的定性检测。此外，纤维微杆菌属在 TSB 液体培养基作为预培养体系及 32 h 的预培养时间条件下，增幅 ATP 生物发光快检技术同样适用。

对于制药用水中分离所得微生物的检测，除纤维微杆菌属选择 TSB 液体培养基作为预培养体系外，其余试验菌株均可选用 R2A 液体培养基作为预培养体系，在相应的预培养时间节点检测结果均为“positive”，表明这些菌株适合使用增幅 ATP 生物发光快检技术进行定性检测。值得注意的是，葡萄球菌属、纤维微杆菌属、短杆菌属、草螺菌属在原定的预培养时间节点检测结果为“negative”，但在预培养时间延长 8 h 后，检测结果变为“positive”。为了确保检测准确性，建议在检测这些菌株时适当延长预培养时间。所有试验菌株的最短检测时间为 8 h，最长检测时间为 56 h，17 株菌可在 48 h 内检出。

3 讨论

本研究对 8 家制药企业生产用制药用水中的环境菌株进行了采集、分离与鉴定，建立了针对国内企业制药用水系统的环境菌库。鉴定结果与文献报道[14—15]的制药用水系统常见分离微生物类群相符，包括鞘氨醇单胞菌属、罗尔斯通菌属、不动杆菌属、伯克霍尔德菌属、甲基杆菌属、莫拉菌属等，这些微生物对营养需求低，能在寡养水环境中生长，并具有较强的生物膜形成能力。部分菌属（如伯克霍尔德菌属）对常见消毒剂和抗菌药具有耐药性，难以通过常规消毒手段清除。相比之下，革兰阳性菌、霉菌和酵母菌通常不适合在水系统中生存和定殖，其检出多与取样或检测过程中的外源性污染相关[6]。制药企业如对自身制药用水系统缺乏深入了解，会导致微生物监测效果不佳且资源浪费，通过分析制药用水系统中的微生物数量、种类及特性，建立专属菌库，可为制定监测策略和有针对性的控制措施提供参考[16]。

在研究增幅 ATP 生物发光法的适用性时，观察到不同菌株的最低检测浓度差异显著。SHAMA 等[17]总结了大量细菌、细菌芽孢、酵母和真菌芽孢的细胞内 ATP 含量，发现不同类群微生物的 ATP 含量存在显著差异，且同一种类的微生物在不同环境（如自然环境与实验室培养）中 ATP 含量也有所不同。细菌的自身状态及其生长条件也是影响细胞内 ATP 含量的重要因素。根据生长特性研究，短杆菌属、叶瘤杆菌属和葡萄球菌属在 R2A 液体培养基中的生长曲线延滞时间与其最适培养体系差异较大，检测限为 1.0×10^3 ～ 1.0×10^4 cfu/mL，在更适宜培养体系下的检测灵敏度尚需进一步研究。

增幅 ATP 生物发光快检技术在某些菌株检测时需超过 24 h，实际应用中可根据菌库情况选择最短检测时间。对于检测灵敏度不足的菌株，建议结合预培养步骤以提高灵敏度。在实际应用中，如果注

射用水系统微生物控制情况较为稳定，大部分样品检测结果为小于 1 cfu，可使用该技术结合适当的预培养用于注射用水检测。在纯化水系统，根据实际情况可选择不经预培养直接检测，在 1 h 内即可获得检测结果，作为药典方法的补充进行微生物污染情况的快速评估。该技术还适用于其他以水系统微生物为主要污染源的样品检测，但需评估样品特性对检测结果的影响。

综上所述，与传统检测方法相比，增幅 ATP 生物发光快检技术显著缩短了检测时间，从 5 d 减少至约 2 d，同时以荧光强度检测替代了传统肉眼观察，实现了更快速、客观地检测，显著提升了数据的完整性和可靠性，为制药用水系统的微生物污染控制提供了有力支持。该技术可作为传统检测方法的补充，用于快速微生物监测和风险评估；可根据情况选择预培养或直接检测，但在应用时需根据具体情况进行优化，确保检测结果的准确性和可靠性。

参考文献：

[1] 郑小玲, 王银环, 曹 炜, 等. 高风险注射剂生产企业制药用水系统微生物菌库的建立和分析 [J]. 中国现代应用药学, 2021, **38**(9): 1065-1068.

[2] SANDLE T. Characterizing the microbiota of a pharmaceutical water system-a metadata study [J]. *SOJ Microbiol Infect Dis*, 2015, **3**(2): 1-8.

[3] 袁 力, 余 萌, 王似锦, 等. 药品微生物实验室水系统分离 37 株微生物的鉴定及分析 [J]. 食品与药品, 2020, **22**(5): 352-357.

[4] 李 珏, 王知坚, 郑小玲. 制药用水微生物检验方法合理性的探讨 [J]. 中国现代应用药学, 2014, **31**(6): 735-738.

[5] 杨晓莉, 李 辉, 绳金房. 中、美、英、欧药典制药用水微生物检查法对比研究 [J]. 西北药学杂志, 2013, **28**(5): 515-517.

[6] 国家药典委员会. 关于 9209 制药用水微生物监测和控制指导原则标准草案的公示 [EB/OL]. [2024-07-26]. https://www. chp. org. cn/#/business/standard.

[7] 胡玉霞, 吴颌森, 张瑞祥, 等. 基于多波长透射光谱的水体细菌微生物活性快速检测方法 [J]. 光谱学与光谱分析, 2025, **45**(7): 1857-1865.

[8] LIU S, ZHAO J, GUO Y, *et al*. Application of ATP-based bioluminescence technology in bacterial detection: a review [J]. *ANALYST*, 2023, **148**(15): 3452-3459.

[9] 中国香料香精化妆品工业协会. 化妆品微生物定性检验方法 ATP 生物荧光增幅法 : T/CAFFCI 46—2024[S]. 北京 : 中国标准出版社, 2024.

[10] 王丽芸, 李 新, 杨佳生, 等. 基于 ATP 生物发光法的微生物数量快速检测技术的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2022, **49**(8): 3451-3468.

[11] 张 桐, 谢茂梅, 刘艺丹, 等. 三磷酸腺苷生物发光法在提高复杂样品细菌检测能力方面的应用研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2024, **15**(14): 1-8.

[12] GUEST M, PICKARD B, SMITH B, *et al*. The use of amplified ATP bioluminescence for rapid sterility testing of drug product formulations [J]. *PDA JPST*, 2023, **77**(5): 402-411.

[13] SPAETH S, TRAN Q, LIU Z. A rapid microbial screening method for in-process biologics [J]. *PDA JPST*, 2018, **72**(6): 574-583.

[14] 章旭红, 郑小玲, 龚万紫, 等. 制药用水系统微生物菌群特性分析及培养探讨 [J]. 中国现代应用药学, 2023, **40**(18): 2608-2616.

[15] 李樱红, 张林爽, 李 珏, 等. 制药用水系统中主要微生物类型及控制措施 [J]. 中国现代应用药学, 2024, **41**(3): 415-419.

[16] 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.

[17] SHAMA G, MALIK D J. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays [J]. *Int J Hyg Envir Heal*, 2013, **216**(2): 115-125.