GMP 洁净室沉降菌动态监测培养基适用性验证

王　霞，徐婷婷，张光华，宣　泽，姚　瑛*

（北京市药品检验研究院，北京市疫苗检验中心，国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室，北京 102206）

摘要：该研究将洁净室沉降菌动态监测培养基暴露 4 h 后进行培养基适用性研究。参照《药品生产质量管理规范（2010 年修订版）》（GMP）附录Ⅰ及《中华人民共和国药典》2020 年版（ChP 2020）四部通则 9205 技术要求，选择在生物安全柜内将 6 组（每组 40 块）直径 90 mm 的胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA）预灌装平板，分别暴露 30 min 和 4 h，称量质量后计算失水率，并按照 ChP 2020 四部通则 1105 采用涂布法进行培养基适用性验证。结果表明，在温度 17 ～ 26 ℃、相对湿度 12%～ 63%、下降气流流速 0.32 ～ 0.33 m/s、流入气流速度 0.54 ～ 0.56 m/s 的条件下，培养基失水率最高为 27.84%，各验证菌回收比值均在 0.5 ～ 2.0，可确认洁净室沉降菌动态监测培养基暴露 4 h，符合 ChP 2020 四部通则 1105 培养基适用性验证要求。

关键词：洁净室；沉降菌动态监测；培养基失水率；回收试验；培养基适用性

中图分类号：R917；TQ460.8^{+}2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2025)12-1570-06

引用：王　霞, 徐婷婷, 张光华, 等. GMP 洁净室沉降菌动态监测培养基适用性验证 [J]. 中国医药工业杂志, 2025, **56**(12): 1570-1575. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.12.011

Validation of the Applicability of Culture Media for Dynamic Monitoring of Settling Microbes in GMP Cleanrooms

WANG Xia, XU Tingting, ZHANG Guanghua, XUAN Ze, YAO Ying*

(*NMPA Key Lab. of Research and Evaluation of Generic Drugs, Beijing Center for Vaccine Control, Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206*)

ABSTRACT: The applicability of culture media after 4-hour exposure for dynamic monitoring of settling microbes in cleanrooms was validated in this study. Referring to the technical requirements of Appendix Ⅰ of "Good Manufacturing Practice (2010 Revision)" (GMP) and Chinese Pharmacopoeia 2020 Edition (ChP 2020) Part Ⅳ, General Chapter 9205, six groups of 40 prefilled plates (with 90 mm diameter) containing tryptic soy agar (TSA) were separately exposed in a biosafety cabinet for 30 min and 4 h, respectively. After exposure, the plates were weighed to calculate water loss rate, and media applicability was validated using the spread plate method in accordance with the ChP 2020 General Chapter 1105. The results showed that under the conditions of temperature of 17 – 26 ℃, relative humidity of 12% – 63%, descending airflow velocity of 0.32 – 0.33 m/s, and inflow airflow velocity of 0.54 – 0.56 m/s, the maximum water loss rate of the medium was 27.84%, and the recovery ratios of all tested bacteria ranged from 0.5 to 2.0. This study confirmed that the 4-hour exposure of culture medium for dynamic monitoring of settled plates in cleanrooms met the requirements of General Chapter 1105 of the ChP 2020.

Key Words: cleanroom; dynamic monitoring of settling microbes; water loss rate of culture media; recovery study; applicability of culture media

收稿日期：2025-05-09

作者简介：王　霞，本科，从事医药环境洁净领域质量研究及微生物等相关检测工作。

通信作者：姚　瑛，副主任药师，从事药品、保健食品及洁净环境质量研究工作。

《药品生产质量管理规范（2010 年修订版）》（GMP）附录Ⅰ和 ChP 2020 年版（ChP 2020）四部通则 9205《药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则》都强调在洁净区采用在线和动态监测方法

实施微生物监测。其中，沉降菌动态监测培养基暴露时间均为 4 h，同一位置可使用多个沉降碟连续监测并累计计数[1—3]。使用一个沉降碟暴露 4 h 或多个沉降碟连续监测，可能会因培养基失水而影响微生物正常生长[4]。欧盟 GMP 和 WHO 规定沉降碟最多暴露 4 h，其后应按要求更换，具体暴露时间的确定应基于验证研究（包括微生物回收研究），暴露时间不应对所用培养基的适用性产生任何负面影响。《药品 GMP 指南：无菌药品》中要求无菌药品沉降碟暴露时间应不少于 30 min、不大于 4 h，并应对沉降碟的暴露时间进行确认，以保证暴露后的培养基不会因失水等原因而影响微生物的正常生长。目前，对洁净环境培养基暴露 4 h 时的失水率及验证培养基适用性的研究较少，仅颜宾等[5]在对沉降碟暴露时间的考察中利用 3 个平皿对 3 株菌进行了考察。

本研究根据《医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法：GB/T 16294—2010》[1]及 ChP 2020 四部通则 1105《非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法》的要求，对沉降菌暴露时间、失水率和微生物回收进行研究，以期为 GMP 洁净室沉降菌的动态监测提供参考。

1 仪器与试药

XSR4001S/A 型电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；610 型温湿度计（德国 Testo 公司）；AP500 型风速仪（美国 TSI 公司）。

胰酪大豆胨琼脂培养基（tryptic soy agar，TSA，北京奥博星生物技术有限责任公司，批号 20241021）。

枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）[CMCC(B)63501]、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）[CMCC(B)10104]、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌（*Escherichia coli*）[CMCC(B) 44102]、白念珠菌（*Candida albicans*）[CMCC(F)98001]、黑曲霉（*Aspergillus niger*）[CMCC98003]，以上菌株均购自中国食品药品检定研究院，菌株传代次数均为第 3 代。

2 方法与结果

2.1 试验环境

2.1.1 试验区域

设置生物安全柜的下降气流流速 0.32～0.33 m/s，流入气流速度 0.54～0.56 m/s。GMP 附录 1《无菌药品》对单向流风速的要求为：A 级区域的风速为 0.36～0.54 m/s，高于其他级别的洁净区。而风速是造成培养基失水的重要因素，风速越高，培养基脱水越多。按照风险分析原则，试验区域选择在安全柜中。生物安全柜还能够提供 A 级环境，防止暴露过程中的微生物污染。

2.1.2 试验条件

不同洁净室的温度、相对湿度控制要求不同。日常洁净室温度控制在 18～26 ℃，相对湿度控制在 45%～65%。根据产品的生产需求，相对湿度最低可控制在 30%。由于相对湿度对培养基暴露失水率的影响较大，应尽量选择相对湿度低的环境条件进行测试。本实验室能达到的最低湿度为 12%，故选用。

2.2 TSA 平板暴露试验

提前 0.5 h 开启安全柜，并开启紫外灯消毒。为避免偶然性、考察重复性，同时兼顾安全柜承载量，每株菌每个暴露时间段选取 20 个平皿。取 20 个平板为 1 组，共 2 组，对每个平板上做标记。常温放置 0.5 h 时对每个平板进行称量，记作初始质量。

将 40 个 TSA 平板均匀铺设在操作台上，打开平板盖，按照每排 8 个，放置 5 排。编号为 1～12 的平板处于垂直单向流（风速 0.32～0.33 m/s）环境，编号为 13～20 的平板处于风速较大（风速 0.54～0.56 m/s）位置，具体放置位置如图 1 所示。放置完成后开始计时，分别暴露 30 min 和 4 h；收集 2 组平板进行称量。每次试验 1 种菌株，共进行 6 组试验，

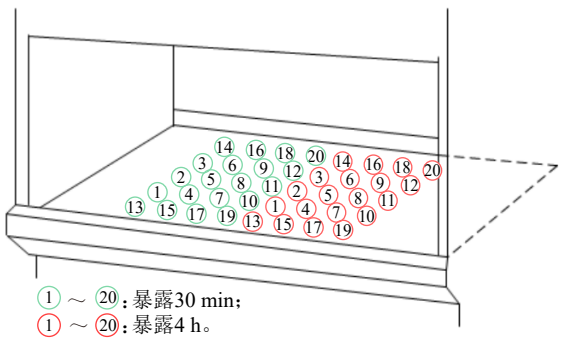


图 1 平板放置示意图

Fig.1 Schematic Diagram of Culture Plate Placement

按 ChP 2020 四部通则 1105 要求进行操作。

2.2.1 金黄色葡萄球菌暴露试验结果

在环境温度 21 ℃、相对湿度 46％的条件下，取菌悬液 100 μL（含金黄色葡萄球菌 50 ～ 100 cfu）。分别对暴露 30 min 和 4 h 的 40 个 TSA 平板进行涂布接种，于 33 ℃培养 3 d，逐日观察。计算暴露 4 h 平板相对于暴露 30 min 平板的微生物回收菌落数，结果如图 2 所示。金黄色葡萄球菌暴露 4 h 与暴露 30 min 的回收比值均为 0.5 ～ 2。

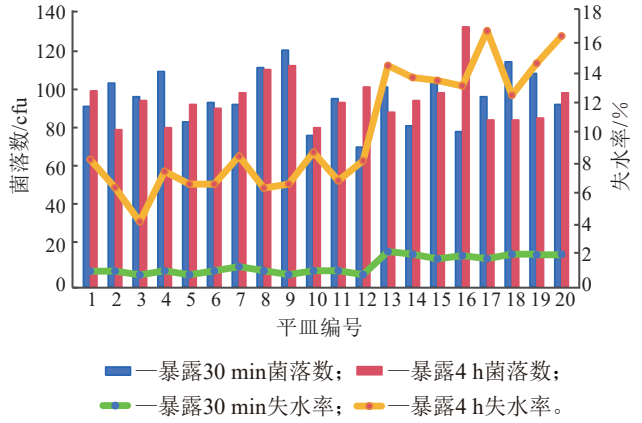


图 2　金黄色葡萄球菌 TSA 平板的暴露失水率及菌落数

Fig.2　Exposure Water Loss Rates and Colony Numbers of *Staphylococcus aureus* TSA Plates

2.2.2 白念珠菌暴露试验结果

在环境温度 21 ℃、相对湿度 46％的条件下，取菌悬液 100 μL（含白念珠菌 50 ～ 100 cfu），分别对暴露 30 min 和 4 h 的 40 个 TSA 平板进行涂布接种，于 33 ℃培养 5 d，逐日观察。计算暴露 4 h 平板相对于暴露 30 min 平板的微生物回收菌落数，结果如图 3 所示。同样，白念珠菌暴露 4 h 与暴露 30 min 的回收比值均为 0.5 ～ 2。

2.2.3 大肠埃希菌暴露试验结果

在环境温度 19 ℃、相对湿度 12％的条件下，取菌悬液 100 μL（含大肠埃希菌 50 ～ 100 cfu），分别对暴露 30 min 和 4 h 的 40 个 TSA 平板进行涂布接种，于 33 ℃培养 3 d，逐日观察。计算暴露 4 h 平板相对于暴露 30 min 平板的微生物回收菌落数，结果如图 4 所示。大肠埃希菌暴露 4 h 与暴露 30 min 的回收比值也均为 0.5 ～ 2。

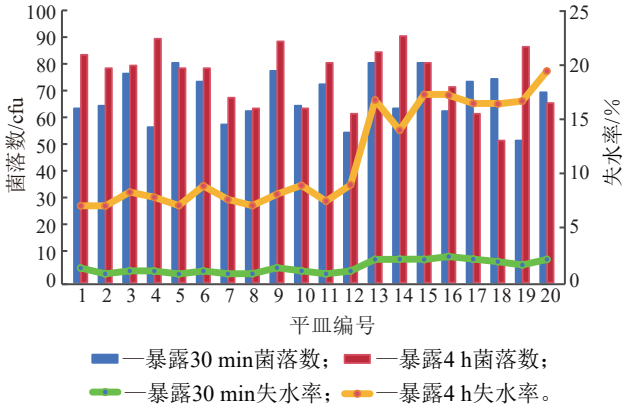


图 3　白念珠菌 TSA 平板的暴露失水率及菌落数

Fig.3　Exposure Water Loss Rates and Colony Numbers of *Candida albicans* TSA Plates

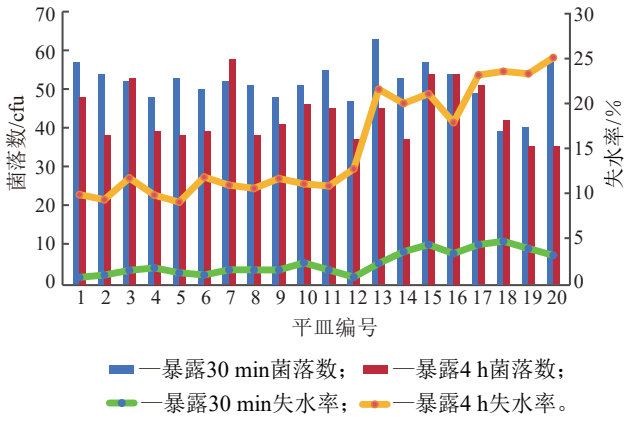


图 4　大肠埃希菌 TSA 平板的暴露失水率及菌落数

Fig.4　Exposure Water Loss Rates and Colony Numbers of *Escherichia coli* TSA Plates

2.2.4 枯草芽孢杆菌暴露试验结果

在环境温度 24 ℃、相对湿度 12％的条件下，取菌悬液 100 μL（含枯草芽孢杆菌 50 ～ 100 cfu）。分别对暴露 30 min 和 4 h 的 40 个 TSA 平板进行涂布接种，于 33 ℃培养 3 d，逐日观察。计算暴露 4 h 平板相对于暴露 30 min 平板的微生物回收菌落数，结果如图 5 所示。枯草芽孢杆菌暴露 4 h 与暴露 30 min 的回收比值均为 0.5 ～ 2。

2.2.5 黑曲霉暴露试验结果

在环境温度 23 ℃、相对湿度 63％的条件下，取菌悬液 100 μL（含黑曲霉 30 ～ 50 cfu），分别对暴露

30 min 和 4 h 的 40 个 TSA 平板进行涂布接种，于 33 ℃培养 5 d，逐日观察。计算暴露 4 h 平板相对于暴露 30 min 平板的微生物回收菌落数，结果如图 6 所示。黑曲霉暴露 4 h 与暴露 30 min 的回收比值均为 0.5 ～ 2。

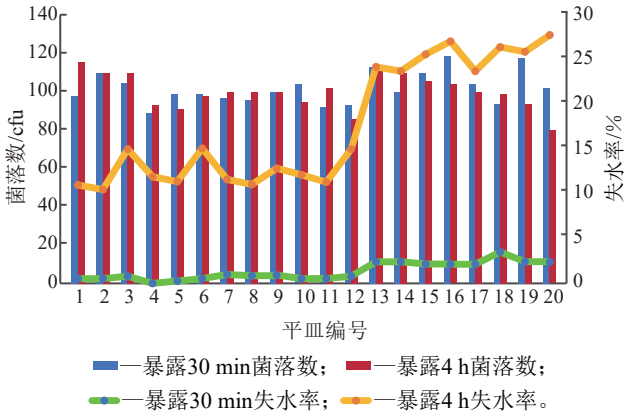


图 5 枯草芽孢杆菌 TSA 平板的暴露失水率及菌落数

Fig.5 Exposure Water Loss Rates and Colony Numbers of *Bacillus subtilis* TSA Plates

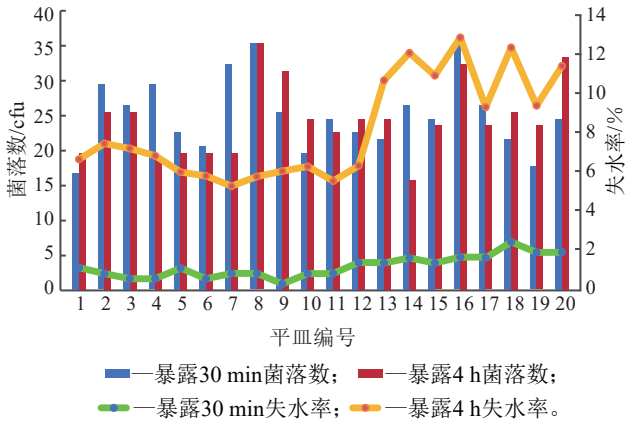


图 6 黑曲霉菌 TSA 平板的暴露失水率及菌落数

Fig.6 Exposure Water Loss Rates and Colony Numbers of *Aspergillus niger* TSA Plates

2.2.6 铜绿假单胞菌暴露试验结果

在环境温度 21 ℃、相对湿度 51%的条件下，取菌悬液 100 μL（含铜绿假单胞菌 50 ～ 100 cfu）。分别对暴露 30 min 和 4 h 的 40 个 TSA 平板进行涂布接种，于 33 ℃培养 3 d，逐日观察。计算暴露 4 h 平板相对于暴露 30 min 平板的微生物回收菌落数，结果如图 7 所示。铜绿假单胞菌暴露 4 h 与暴露 30 min 的回收比值均为 0.5 ～ 2。

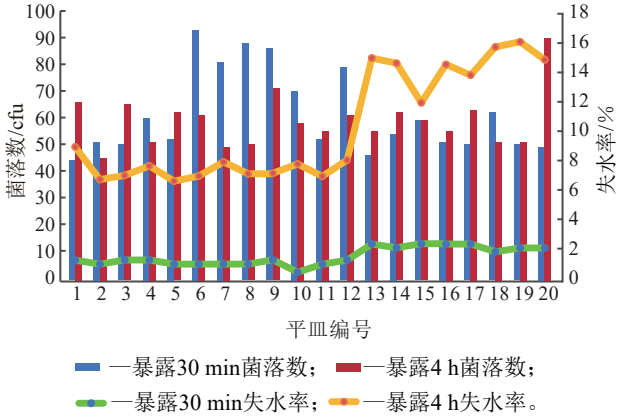


图 7 铜绿假单胞菌 TSA 平板的暴露失水率及菌落数

Fig.7 Exposure Water Loss Rates and Colony Numbers of *Pseudomonas aeruginosa* TSA Plates

2.3 培养基适用性试验

按 ChP 2020 四部通则 1105 进行。取金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、黑曲霉和白念珠菌菌悬液 100 μL（含菌 30 ～ 100 cfu）。分别对暴露 30 min 和 4 h 的 40 个 TSA 平板进行涂布。接种细菌的培养基平板，于 33 ℃培养 3 d，逐日观察；接种真菌的培养基平板，于 33 ℃培养 5 d，逐日观察。计算暴露 4 h 平板相对于暴露 30 min 平板的微生物回收比值。

本研究中所有菌株暴露 4 h 的 20 个平皿菌落数平均值与暴露 30 min 的 20 个平皿菌落数平均值的微生物回收比值称作“回收比值①”，暴露 4 h 的 20 个平皿菌落数最小值相对暴露 30 min 的 20 个平皿菌落数最大值的回收比值称作“回收比值②”。试验结果如表 1 所示。可见，2 种回收比值均在 0.5 ～ 2，表明失水率低于 27.84%时，培养基适用性符合 ChP 2020 四部通则 1105 要求。

3 讨论

3.1 TSA 培养基平板暴露失水率的影响因素

时间、风速、温度和相对湿度对 TSA 培养基平板暴露失水率的影响结果如图 8 所示。所有暴露 4 h 的培养基平板失水率均大于暴露 30 min 的培养基平板，编号为 1 ～ 12 的平板失水率显著低于编号为 13 ～ 20 的平板，提示风速对培养基失水影响很大。

表 1　暴露 4 h 平板相对于暴露 30 min 平板的培养基适用性试验结果

Tab.1　Results of Medium Applicability Tests for Plates Exposed for 4 h vs. 30 min

结果	菌种					
	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	大肠埃希菌	黑曲霉菌	白念珠菌
暴露 30 min 平板上的菌落数均值 /cfu	98	102	62	52	26	69
暴露 4 h 平板上的菌落数均值 /cfu	96	100	60	45	25	76
暴露 30 min 平板上的菌落数最大值 /cfu	122	119	94	64	36	82
暴露 4 h 平板上的菌落数最小值 /cfu	81	80	49	36	18	53
回收比值①	0.98	0.98	0.96	0.86	0.97	1.10
回收比值②	0.66	0.67	0.52	0.56	0.50	0.65

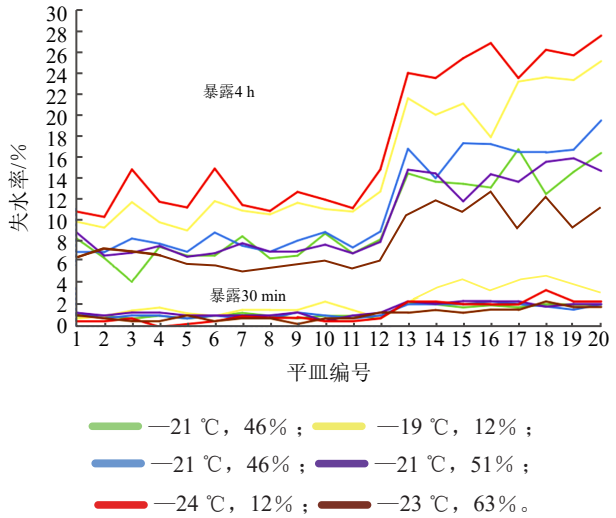


图 8　时间、风速、温度和相对湿度对平板暴露失水率的影响

Fig.8　Effects of Time, Wind Speed, Temperature and Relative Humidity on Exposure Water Loss Rates of Plates

因此，建议布置沉降碟位置时尽量避免风口直吹。相对湿度对失水也有较大影响：相对湿度 12%环境放置的平板失水率显著高于放置于相对湿度 45%～65%的平板；当摆放于相对湿度 12%且风速较大的位置时，暴露 4 h 的平板失水率最高达到 27.84%。本研究中，温度控制在洁净室要求范围内，对失水率的影响不大。

本次试验环境为洁净室极端挑战性环境，即相对湿度 12%、风速 0.54 ～ 0.56 m/s，在此条件下培养基暴露 4 h 的最大失水率为 27.84%。洁净室一般控制如下：温度 18 ～ 28 ℃，相对湿度 45%～ 65%，单向流工作区域平均风速 0.36 ～ 0.54 m/s。这些条件比本研究的环境条件温和，因而可推测正常情况下，培养基暴露 4 h 的失水率会远低于极端环境的 27.84%。

3.2　TSA 平板失水率对菌落数的影响

TSA 平板失水率对菌落数的影响如图 9 所示。可见，各菌株的菌落数均匀分布，在失水率低于 27.84%时，所有菌株菌落数的回收比值①和②都满足了 0.5 ～ 2 的要求，符合 ChP 2020 四部通则 1105 对培养基适用性的要求。由此可见，在失水率低于 27.84%的情况下，菌落计数与失水率不相关。

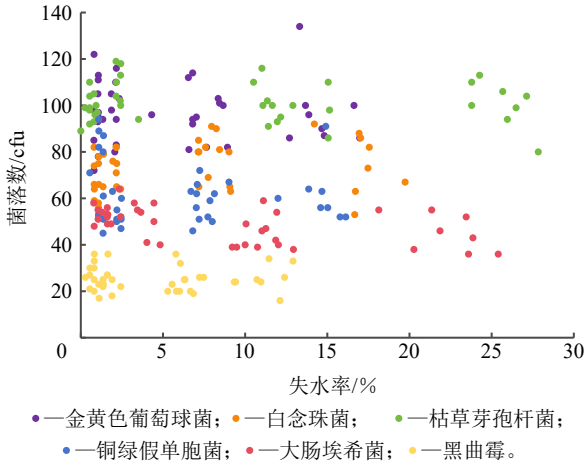


图 9　TSA 平板失水率对菌落数的影响

Fig.9　Effect of Water Loss Rate of TSA Plates on Colony Number

日常的沉降菌动态监测期间，通常按《洁净室施工及验收规范：GB 50591—2010》[2] 的要求，每 1 h 更换 1 次培养基平板，连续更换 4 次，累计计数。由于人是洁净室的最大污染源，每次更换培养基平板都会增加人员进出频次，加剧污染风险，同时增加了人员工作量及耗材使用量。而本研究证明在沉

降菌动态监测中，TSA 培养基暴露 4 h，培养基适用性仍符合 ChP 2020 四部通则 1105 要求。该结果可为洁净环境沉降菌动态监测中培养基平板更换频率的确定提供一定的数据支持。

参考文献：

[1] 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.

[2] 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查检疫总局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查检疫总局. 洁净室施工及验收规范: GB 50591—2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[3] 晏 明, 韩丽萍, 张 强, 等. 制剂室 A 级洁净区沉降菌动态监测 [J]. 解放军医学学报, 2012, **28**(1): 89-90.

[4] 李天蓁, 齐 岩. 沉降菌测试暴露时间与培养基失水率和微生物回收率的考察与研究 [J]. 生物技术世界, 2016, (4): 243-244.

[5] 颜 宾, 赵方方. 沉降菌测试沉降碟暴露时间的考察与研究 [J]. 生物技术世界, 2013, **10**(4): 60.

（上接第 1552 页）

applications [J]. *Biomater Sci*, 2021, **9**(5): 1609-1626.

[2] KARIMI B, GANJI N, POURSHIANI O, *et al*. Periodic mesoporous organosilicas (PMOs): from synthesis strategies to applications [J]. *Prog Mater Sci*, 2022, **125**: 100896.

[3] LV J, YANG S, ZHANG W, *et al*. Preparation of hollow mesoporous silica-based carriers for loading and release of fenofibrate [J]. *Russ J Gen Chem*, 2024, **94**(1): 193-203.

[4] ZHANG W J, ZHAO X Y, LU J W, *et al*. Progresses on hollow periodic mesoporous organosilicas: preparation and application in tumor therapy [J]. *J Inorg Mater*, 2022, **37**(11): 1192-1202.

[5] 冯巧巧, 张天佑, 刘 荣, 等. 非诺贝特制剂的研究进展 [J]. 药学研究, 2023, **42**(3): 199-203.

[6] AMIDON G L, LENNERNÄS H, SHAH V P, *et al*. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in-vitro* drug product dissolution and *in-vivo* bioavailability [J]. *Pharm Res*, 1995, **12**(3): 413-420.

[7] 溥 榕, 樊丽娟, 肖 峰, 等. 贝特类药物制剂研究进展 [J]. 云南化工, 2023, **50**(11): 11-15.

[8] 魏亚青. 中空型介孔二氧化硅载体的制备及释药机制研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学硕士学位论文, 2020.

[9] WANG H S, GAO X H, WANG Y N, *et al*. Effect of amine functionalization of SBA-15 on controlled baicalin drug release [J]. *Ceram Int*, 2012, **38**(8): 6931-6935.

[10] 朱桂茹, 杨启华, 李 灿. 乙烷桥键介孔材料的制备及其在反相液相色谱中的应用 [J]. 色谱, 2007, **25**(4): 505-508.

[11] JADHAV N V, VAVIA P R. Dodecylamine template-based hexagonal mesoporous silica (HMS) as a carrier for improved oral delivery of fenofibrate [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2017, **18**(7): 2764-2773.

[12] 肖 伟. 双功能介孔硅材料负载手性铱、钌和铑催化剂的制备、表征及催化研究 [D]. 上海: 上海师范大学硕士学位论文, 2015.

[13] 宋佳欣, 崔 静, 范晓强, 等. 介孔二氧化硅负载高分散钒催化剂的制备及乙烷选择氧化性能 [J]. 高等学校化学学报, 2023, **44**(2): 87-94.

[14] 严家瑞, 严 真, 尹莉芳. 注射用环糊精包合物研究进展 [J]. 药学研究, 2023, **42**(5): 289-297.