

中图分类号: R95 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)07-0040-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.07.007



高风险制药企业环境菌库构建与风险分析*

徐玲笑¹, 郑晓琴², 方芳¹, 周勇¹, 黄华^{1△}, 胡佳晨¹

(1. 浙江省衢州市食品药品检验研究院, 浙江 衢州 324000; 2. 浙江巨泰药业有限公司, 浙江 衢州 324000)
摘要:目的 建立高风险制药企业环境菌库,并基于多维度数据开展污染风险分析。方法 以某高风险药品生产企业为研究对象,于2023年1月至8月按企业环境监测方案采集空气、人员、水系统、表面、原辅料、成品6个来源的微生物样本。采用细菌16S rRNA基因和真菌转录间隔区测序进行菌种鉴定,并分析其种类、变化趋势、检出频率。结果 共分离出671株菌株。环境菌库中以革兰氏阳性菌为主(63.79%),优势菌属为葡萄球菌属(29.96%)、微球菌属(14.75%);A级、B级、C级区均检出红酵母属,B级、C级区共享人源相关菌群,U级区富集水系统相关革兰氏阴性菌。5月至8月的微生物群落结构、数量变化显著。结论 基于基因测序鉴定的环境菌库可用于识别制药环境中的污染来源与潜在传播路径,为消毒效果评估与过程控制提供数据支撑,有助于提升产品质量。

关键词:高风险制药企业;环境菌库;微生物鉴定;16S rRNA基因测序;真菌转录间隔区测序;风险分析

Construction and Risk Analysis of Environmental Microbiota Repository in High - Risk Pharmaceutical Enterprises

XU Lingxiao¹, ZHENG Xiaoqin², FANG Fang¹, ZHOU Yong¹, HUANG Hua^{1△}, HU Jiachen¹

(1. Quzhou Institute for Food and Drug Control, Quzhou, Zhejiang 324000, China; 2. Zhejiang Jutai Pharmaceutical Co., Ltd., Quzhou, Zhejiang 324000, China)

Abstract: Objective To establish an environmental microbial repository for high - risk pharmaceutical enterprises, and to conduct pollution risk analysis based on multidimensional data. **Methods** A high - risk drug production enterprise was selected as the research object, and microbial samples were collected from six sources including air, personnel, water system, surface, raw materials, and finished products from January to August 2023 according to the enterprise environmental monitoring plan. Bacterial 16S rRNA gene and fungal internal transcribed spacer (ITS) sequencing were used for strain identification, and the species, variation trends, and detection frequencies were analyzed. **Results** A total of 671 strains were isolated. The microbiota repository was predominantly composed of gram - positive bacteria (63.79%), with *Staphylococcus* (29.96%) and *Micrococcus* (14.75%) as the dominant genera. *Rhodotorula* was detected in the grade A, B, and C zones. Personnel - associated bacterial communities were observed in grade B and C zones. Water system - associated gram - negative bacteria were enriched in the grade U zone. The microbial community structure and quantity showed significant changes from May to August. **Conclusion** The environmental microbiota repository based on gene sequencing identification can be used to identify pollution sources and potential transmission pathways in pharmaceutical environments, which can provide data support for disinfection efficacy evaluation and process control, and improve the quality of products.

Key words: high - risk pharmaceutical enterprises; environmental bacterial repository; microbial identification; 16S rRNA gene sequencing; fungal internal transcribed spacer sequencing; risk analysis

《药品生产质量管理规范(2010年修订)》指出,制药企业必须实施严格的环境监控措施,特别是作为高风险制药企业的无菌药品生产企业,应将微生物污染风险控制在最低水平^[1]。环境监控数据中的微生物数据

* 基金项目:浙江省药品监督管理局2023年科技计划项目[2023024];浙江省衢州市科技攻关项目[2022K134]。

第一作者:徐玲笑,女,大学本科,副主任药师,研究方向为食品、药品、化妆品微生物检验,(电子信箱)16234027@qq.com。

△通信作者:黄华,女,土家族,大学本科,主任药师,研究方向为药物检测与质量标准,(电子信箱)43719437@qq.com。



产权报,2018-01-17(005).

[13] 程裕东. 破解高校专利“转化难”、企业专利“获取难”[EB/OL]. (2024-11-27)[2025-06-26]. <https://export.shobserv-er.com/baijiahao/html/823094.html>.

[14] 谢伟. 中国高校专利转化运用的状况、困境、要素与进路重构[J]. 中国高校科技, 2024(11):75-82.

[15] 薛江华, 邵启文. 委员建议:多举措促进粤东粤西粤北知识产权均衡发展[N/OL]. (2023-11-24)[2025-06-26].

<https://www.163.com/dy/article/IK9SMISO0514R90M.html>.

[16] 张理, 李雨晴, 李沿峰, 等. 基于专利文献分析广东省生物医药发展态势[J]. 中国药业, 2024, 33(21):1-6.

[17] 张丽娜. 河南南阳:打造中医药文化、事业、产业新高地[EB/OL]. (2024-12-21)[2025-06-26]. https://hn.cnr.cn/hnpdgb/hngexb/20241221/t20241221_527016595.html.

(收稿日期:2025-09-02;修回日期:2026-02-25)

不仅需关注定量指标,还应重视微生物种类、特性分析。建立完善的环境菌库,是保障无菌药品生产质量的重要组成部分^[2-3]。近年来,随着环境菌库建设重要性的日益凸显及微生物鉴定技术的快速发展、成本降低,越来越多的制药企业特别是高风险制药企业已着手建立环境菌库^[4-7]。如何深入分析相关数据,全面反映环境的实际情况,识别潜在风险点十分重要。传统的单纯基于环境菌种组成占比的分析方法难以系统、全面地评估环境菌库的状态,也不利于早期识别潜在风险点。因此,需引入趋势分析、频率分析等分析方法,以挖掘环境菌库中的风险信息 and 规律。本研究中以1家高风险制药企业为研究对象,初步建立了环境菌库,以期发现潜在风险点和企业建立完善的微生物环境监控方法提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、培养基与试剂

仪器:IPP750型半导体低温培养箱(德国 Memmert 公司);LDZF-50L型压力灭菌器(上海申安医疗器械厂);CX31型显微镜(日本 Olympus 公司);168M2-MS型两头过滤组合集菌仪(德国 Sartorius 公司);MAS-100ECO型浮游菌微生物采样器(德国 Merck 公司);超低温冰箱(美国 Thermo Fisher 公司);3500 MicroSep型全自动微生物基因分析鉴定系统、3730XL型基因分析仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

培养基与试剂:胰酪胨大豆琼脂(STA)培养基;R2A琼脂培养基(青岛海博生物技术有限公司);青霉素酶(中国食品药品检定研究院);2×Phanta Max Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);BigDye™ Terminator v3.1循环测序试剂盒、核酸分离试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 方法

环境微生物收集:按企业环境监控方案,于2023年1月至8月,分别对空气、人员、水系统、表面、原辅料、成品进行微生物样本采集。采用空气撞击法、平板沉降法和接触碟法,使用含300 U青霉素酶的STA培养基分别收集空气、人员、表面、原辅料、成品浮游微生物、沉降微生物和表面微生物,并于33℃培养箱中倒置培养48 h。采用薄膜过滤法,使用R2A琼脂培养基收集水系统微生物,并于33℃培养箱中倒置培养5 d。

菌株分离与保存:取收集到的环境微生物STA培养基、R2A培养基,挑取各单菌,分别进行2次以上平板划浅分离,以获取纯菌落。用一次性接种环挑取纯化后的菌落,接种至磁珠保存管中,置-80℃冰箱中冻存,作为环境微生物实体菌种库。

基因鉴定:采用全自动微生物基因分析鉴定系统

进行细菌16S rRNA基因/真菌转录间隔区(ITS)特征序列进行基因测序与鉴定分析。

2 结果

2.1 微生物种类

共采集环境微生物样本671份,包括洁净等级A级区1份,B级区170份,C级区476份,U级区24份。其中,样本来源以空气为主(581份),其次为水系统(43份)、人员(42份)及表面样本(5份),且原辅料、成品中均未检出微生物。采样方式主要为平板沉降法(584份),辅以接触碟法(46份)、薄膜过滤法(41份)。分离鉴定结果显示,革兰氏阳性菌占比最高(63.79%),其次为革兰氏阴性菌(23.40%)、酵母菌(6.56%)、丝状真菌(5.96%),另有0.29%的菌株无法明确类型。从菌属水平分析,全部菌株分布于73个菌属,优势菌群聚集现象显著。其中,葡萄球菌属为最优势菌属(201株,29.96%),其次为微球菌属(99株,14.75%)、莫拉氏菌属(47株,7.00%)。详见图1。从菌种水平分析,检出率最高的为藤黄微球菌(91株,13.56%),其次为奥斯陆莫拉氏菌、头/山羊葡萄球菌(均占6.71%)。检出率排名前10的菌种中包含具有临床意义及消毒剂抗性的条件致病菌——洋葱伯克霍尔德菌群,其检出率为2.09%。详见图2。

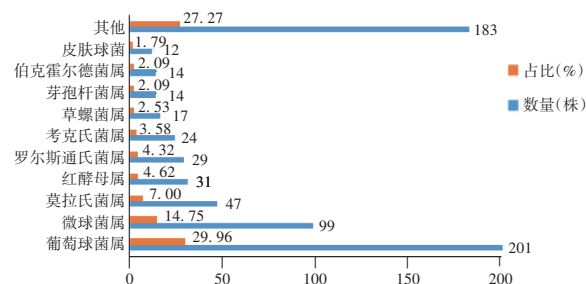


图1 微生物菌属分布情况 (n = 671)

Fig. 1 Distribution of bacteria genera (n = 671)

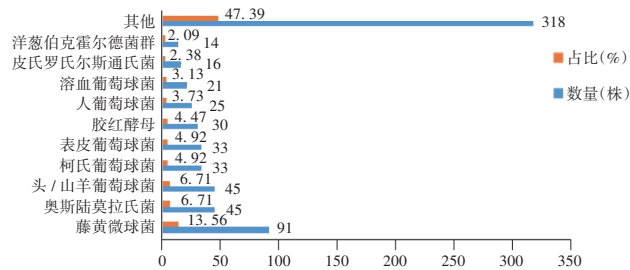


图2 微生物菌种分布 (n = 671)

Fig. 2 Distribution of bacteria species (n = 671)

进一步对不同洁净等级区域的微生物群落进行分析,占比排名前10的微生物菌属见表1。其中,A级区检出了红酵母属,提示高等级洁净区域可能存在特殊的真菌污染风险;B级区以葡萄球菌属(34.71%)、微球菌属(21.18%)为主;C级区虽仍以葡萄球菌属(28.99%)、微球菌属(13.24%)为主,但革兰氏阴性菌的比例显著

增加,其中莫拉氏菌属、红酵母属的检出率均高于B级区;U级区的微生物组成与其他区域有显著差异,如U级区的罗尔斯通氏菌属占比高达29.17%,并检出多种与水系统相关菌属(如草螺菌属)。可见,不同洁净等级区域的微生物分布差异显著,建议针对不同洁净等级区域制订分区监控措施。

表1 不同洁净等级区域占比排名前10的微生物菌属

Tab.1 Top 10 bacteria genera in zones with different cleanliness grades in terms of the proportion

洁净等级	菌属	数量(株)	占比(%)	洁净等级	菌属	数量(株)	占比(%)
A级(n=1)	红酵母属	1	100.0		伯克霍尔德菌属	14	2.94
B级(n=170)	葡萄球菌属	59	34.71		草螺菌属	13	2.73
	微球菌属	36	21.18		芽孢杆菌属	12	2.52
	莫拉氏菌属	12	7.06		考克氏菌属	12	2.52
	考克氏菌属	12	7.06		皮肤球菌属	9	1.89
	曲霉属	6	3.53	U级(n=24)	罗尔斯通氏菌属	7	29.17
	红酵母属	6	3.53		草螺菌属	4	16.67
	棒杆菌属	4	2.35		葡萄球菌属	4	16.67
	短波单胞菌属	3	1.76		鞘氨醇单胞菌属	2	8.33
	皮肤球菌属	3	1.76		短小杆菌属	1	4.17
	玫瑰单胞菌属	3	1.76		尼尔菌属	1	4.17
C级(n=476)	葡萄球菌属	138	28.99		马赛菌属	1	4.17
	微球菌属	63	13.24		莫拉氏菌属	1	4.17
	莫拉氏菌属	34	7.14		迪茨氏菌属	1	4.17
	红酵母属	24	5.04		赖氨酸芽孢杆菌属	1	4.17
	罗尔斯通氏菌属	22	4.62				

2.2 微生物变化趋势

环境微生物表型组成的时间变化趋势见图3。其中,革兰氏阳性菌的年均检出率最高(57.32%),其次为革兰氏阴性菌(26.07%)。值得注意的是,革兰氏阴性菌在1月、5月出现异常峰值(检出率高达40.00%),显著高于平均水平;革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的消长呈明显的负相关关系。相比之下,丝状真菌和酵母菌的检出率则较稳定,其检出率分别维持在9%和8%左右,未表现出明显的季节性波动。进一步对占比排名前10的菌属进行监测发现,优势菌属葡萄球菌属、微球菌属

的检出量在7月达高峰,分别检出了68株、38株;芽孢杆菌属和红酵母属表现出相似的季节特性,均在6月、7月明显增殖,其中芽孢杆菌属在6月的检出量较1月增加了150.00%;伯克霍尔德菌属则呈独特的季节性特征,在8月突增至6株,占该菌属检出总量的42.86%。详见表2。采用Shannon指数评估微生物群落的多样性,指数越大表明微生物物种越丰富。Shannon指数随时间的变化趋势见图4。可见,Shannon指数从1月的3.62升至3月的4.58,4月出现显著低谷(3.01),随后在6月达到峰值(5.29),这一变化与高温、高湿气候条件高度吻合($r = 0.87, P < 0.01$)。进一步分析发现,Shannon指数的波动主要源于革兰氏阴性菌的季节性增殖,特别是6月至8月湿热季节,芽孢杆菌属、伯克霍尔德菌属等环境耐受菌的检出量增加。可见,环境温度、相对湿度是影响微生物群落结构的重要因素。

表2 不同菌属微生物检出量变化趋势(株)

Tab.2 Trends in the detection of microorganisms from different bacterial genera (strain)

菌属	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月
芽孢杆菌属	2	0	1	0	1	5	5	2
红酵母属	1	1	4	4	5	3	12	1
伯克霍尔德菌属	0	1	0	0	0	3	4	6
草螺菌属	4	0	0	0	10	1	0	2
莫拉氏菌属	0	0	2	3	5	14	10	14
罗尔斯通氏菌属	2	4	4	5	7	4	2	2
葡萄球菌属	1	12	10	17	22	44	68	27
皮肤球菌属	0	0	0	0	2	3	7	0
微球菌属	0	4	8	0	6	15	38	27
考克氏菌属	2	1	2	2	2	0	10	4

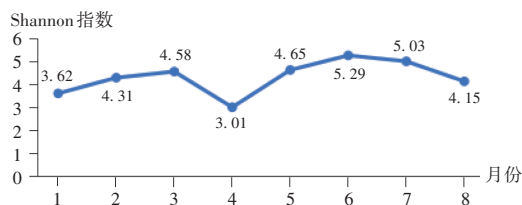


图4 Shannon指数变化趋势

Fig.4 Change trends of the Shannon index

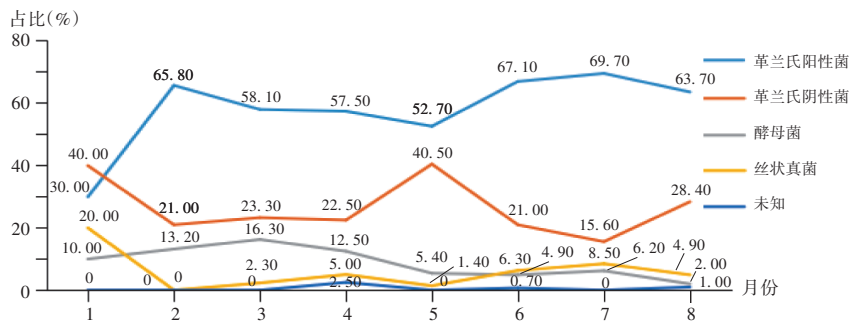


图3 不同表型微生物变化趋势

Fig.3 Change trends in different microbial phenotypes

2.3 微生物检出频率

根据检出频率与连续性,将在超过90%时间点出现且保持80%以上连续性的菌属定义为核心菌群;将在超过60%时间点出现且保持80%以上连续性的菌属定义为持留菌群;其余菌属则定义为暂居菌群。对不同来源微生物群落进行分析发现,其定植状态存在显著差异。人员、水系统及表面样品中均未形成稳定的核心菌群与持留菌群,仅检出少量暂居菌群;空气样品中则识别出稳定的核心菌群(罗尔斯通氏菌属、红酵母属、考克氏菌属)、持留菌群(芽孢杆菌属、葡萄球菌属、莫拉氏菌属),暂居菌群的多样性极高(共检出28个菌属,远多于其他来源)。详见图5。进一步对不同洁净等级区域的菌群进行集合分析发现,B级、C级区共同检出17个菌属,其中以考克氏菌属、微球菌属等革兰氏阳性菌为主;C级、U级区共同检出4个菌属,且均为革兰氏阴性菌,包括罗尔斯通氏菌属、草螺菌属等典型的水系统相关菌属;A级、B级、C级区共同检出红酵母属,且均为胶红酵母,提示可能存在跨区域的物料污染风险;B级、C级、U级区共同检出5个菌属,其中葡萄球菌属、莫拉氏菌属的检出率分别超过80%,60%。详见表3。

表3 不同洁净度等级共有菌属检出情况

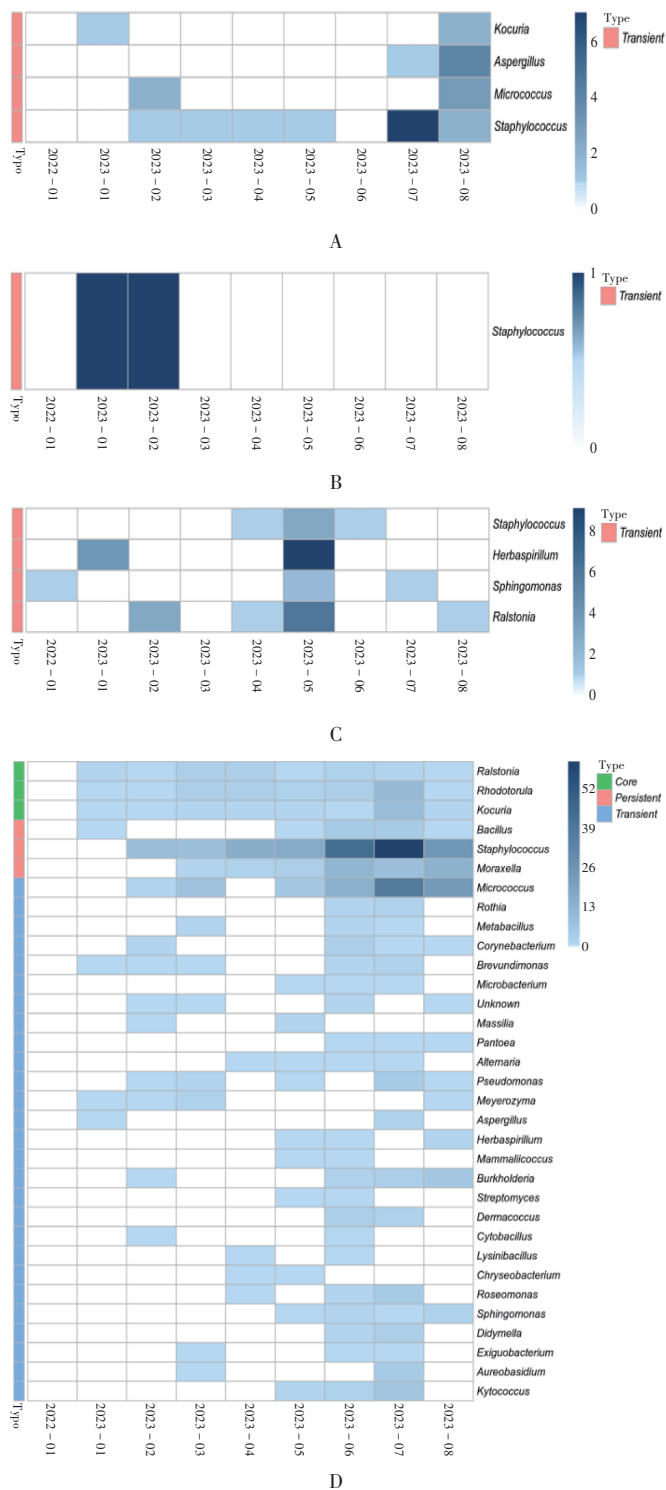
Tab.3 Detection of common bacteria genera with different cleanliness grades

洁净等级	共有菌属
C级/U级	喙枝孢菌属, 罗尔斯通氏菌属, 草螺菌属, 尼尔菌属
B级/C级	短波单胞菌属, 考克氏菌属, 曲霉属, 芽孢杆菌属, 迈耶氏酵母属, 微球菌属, 棒杆菌属, 假单胞菌属, 微小杆菌属, 金黄杆菌属, 玫瑰单胞菌属, 微杆菌属, 哺乳动物球菌属, 皮肤球菌属, 罗氏菌属/鲁氏菌属, 皮生球菌属, 长西氏酵母属
B级/U级	迪茨氏菌属
A级/B级/C级	红酵母属
B级/C级/U级	赖氨酸芽孢杆菌属, 鞘氨醇单胞菌属, 葡萄球菌属, 马赛菌属, 莫拉氏菌属

3 讨论

3.1 微生物群落分布特征

本研究结果显示,葡萄球菌属与微球菌属均为优势菌属,属革兰氏阳性菌,与文献[8-9]的研究结果一致。高等级洁净区域应主要存在粒径 $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 的微粒污染,而真菌污染风险较低^[10-11]。本研究结果显示,在A级、B级、C级区均检出红酵母属菌,且呈从低等级洁净区域向高等级洁净区域传播的趋势,表明物料传输系统可能存在交叉污染风险,提示应重点关注物料传递过程中的污染控制。同时,B级、C级区人源性革兰氏阳性菌属的检出率高,提示现行人员更衣程序或人员行为可能存在缺陷。有研究表明,超过20%的菌株对苯扎氯铵类消毒剂表现出耐受性^[12-13]。C级区洗瓶



A. 人员 B. 表面 C. 水系统 D. 空气

图5 不同来源微生物检出频率

A. Staff B. Surface C. Water system D. Air

间/轧盖间、水系统中均检出的洋葱伯克霍尔德氏菌群属制药行业高风险菌,具有强环境耐受性^[14-15],提示水系统可能作为该菌的持续污染源,需纳入重点监控范围。

3.2 动态变化规律

菌群结构趋势分析结果显示,部分月份多次检出

芽孢杆菌属。该菌属常见于土壤、纸板及植物材料,可经鞋底或设备传入洁净区域,其阶段性检出提示需加强对物料和人员进出与消杀程序的管控。同期多次检出的红酵母属易形成生物膜,并在环境中持续定植,提示应加强对水系统的污染控制,并依托趋势监测数据评估防控措施的有效性。从表型分类趋势来看,2023年1月与5月革兰氏阴性菌的检出率较高。分析原因,这可能与温度、相对湿度等季节性因素相关。在洁净室环境中,革兰氏阴性杆菌多与潮湿环境、水渍残留及湿区操作有关,其控制关键在于保持环境干燥。

尤其需关注水系统的生物膜问题,因该环境多为革兰氏阴性菌,且生物膜可显著增强其存活与污染能力。导致水系统微生物污染的原因包括树脂或过滤器老化、紫外线维护不足、加热不均、泄漏及死水段等。因此,一旦制用水微生物指标超出警戒限或行动限,应及时回溯监测数据、排查问题,并按规程处置。同时,为维持水系统微生物处于受控状态,应定期对贮罐和管道进行清洗与消毒,如巴氏消毒、紫外线及臭氧消毒等。

3.3 检出频率分析的核心价值

对洁净室环境中核心菌群、滞留菌群和暂居菌群的分析具有重要的微生物控制和风险管理意义。核心菌群代表环境中稳定存在、难以清除的本底微生物,其组成可指示长期污染源(如人员、水系统或通风缺陷),是评估环境控制基线水平的关键依据;滞留菌群能耐受常规消毒措施,其存在提示当前清洁消毒策略可能存在漏洞或效力不足,是评价消毒规程有效性的直接指标;暂居菌群主要来源于人员、物料或空气流动引入的瞬时污染,其种类、数量可动态反映操作规范的执行质量与外部污染入侵风险。本研究结果显示,空气样品中检出稳定的核心菌群和滞留菌群,且暂居菌群多样性远高于其他来源,表明空气是微生物聚集与传播的重要媒介;而人员、水系统及表面样品中仅检出暂居菌群,尚未形成固定污染源,提示这些来源的污染控制总体有效。此外,空气与人员样品共享最多菌属,且空气样品中绝对优势菌与人源菌高度一致,表明洁净室空气中的微生物主要源自人员脱落,建议加强人员更衣、行为规范。

3.4 方法评价

本研究中通过系统分析洁净区域微生物群落的基础分布情况,实现了多维度的应用价值。一方面,从空间分布、时间动态、生态功能3个层面揭示了微生物群落的构成特征与变化规律。其中,空间分布分析精准识别了不同洁净等级区域的风险点位,时间动态分析为防控措施的时效性提供了依据,生态功能分类则从理论层面解释了污染物的传播路径与存续状态。另一方面,

本研究中建立的基础菌库可为后续污染微生物的同源性差异度分析提供充分的溯源依据,为药品检验的质量控制提供数据支持。同时,本研究中也存在以下三点局限性。1)监测周期较短,难以全面反映年度变化规律。2)部分区域采样点设置可能不充分。3)未对从各个环节采集到的洋葱伯克霍尔德菌、胶红酵母等高风险菌进行全基因组测序及同源性分析。后续研究将延长监测时间,并增加采样点位密度,并对实验室保存的菌株开展进一步鉴定,以追溯污染来源,获取更具代表性的数据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 药品生产质量管理规范(2010年修订)[A/OL]. (2011-01-17)[2025-08-13]. http://www.gov.cn/gongbao/content/2011_1907093.htm.
- [2] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(11): 1747-1751.
- [3] JIMENEZ L. Microbial Diversity in Pharmaceutical Environments: Implications for Contamination Control [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(2): 287-296.
- [4] 龚万紫, 郑小玲. 制药环境常见微生物数据库的建立及消杀效果研究[J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(13): 2270-2276.
- [5] 洪亮, 潘映秋, 卢启寰, 等. 基于多种微生物鉴定技术的制药企业环境微生物鉴定结果分析和应用研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(21): 3019-3026.
- [6] 郑小玲, 王银环, 曹炜, 等. 高风险注射剂生产企业制用水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.
- [7] 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与群落分析[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(6): 828-835.
- [8] 黄韵璇, 朱晓燕, 高颖, 等. 药品微生物检验环境菌库建立实践[J]. 中国药业, 2025, 34(12): 76-80.
- [9] 郭心怡, 林燕, 曹长雷, 等. 制药企业环境菌库建立的探讨[J]. 工业微生物, 2023, 53(2): 86-88.
- [10] 李静, 王伟, 张红梅. 高级别洁净区微生物污染特征分析[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(8): 1053-1057.
- [11] 刘强, 陈雪, 周明. 制药洁净区真菌污染风险与控制策略[J]. 中国消毒学杂志, 2021, 38(6): 421-425.
- [12] 张敏, 王磊, 陈昊. 医院环境常见菌株对苯扎氯铵耐药性分析及消毒策略优化[J]. 中国消毒学杂志, 2022, 39(4): 241-245.
- [13] 刘芳, 李静, 赵伟. 制药洁净区消毒剂耐受菌监测与轮换方案研究[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(11): 1532-1536.
- [14] 王静, 李强, 张雪梅. 洋葱伯克霍尔德菌复合体的环境适应性及耐药机制研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(5): 489-494.
- [15] 陈明, 刘芳, 周华. 医院水源性洋葱伯克霍尔德菌污染调查及防控策略[J]. 中国消毒学杂志, 2020, 37(8): 561-565.

(收稿日期: 2025-08-14; 修回日期: 2026-01-17)