

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Т.Г. Волова

«__»_____ 2019 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Микробиологический статус биотехнологического
производства полигидроксиалканоатов

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	_____	<u>проф., д-р биол. наук</u>	<u>С. В. Прудникова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Е. А. Соложенникова</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>доцент, к. биол. наук</u>	<u>С. Ю. Евграфова</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия

Красноярск 2019

СОДЕРЖАНИЕ

1 Обзор литературы	7
1.1 Биологическая безопасность биотехнологических производств	7
1.2 Требования к чистым помещениям.....	12
1.3 Способы микробиологического анализа воздуха	16
1.4 Способы очистки воздуха и уборки помещений на производстве .	19
2 Методы исследования.....	24
2.1 Характеристика помещений Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ	24
2.2 Микробиологическое получение полигидроксиалканоатов в условиях Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ	26
2.3 Порядок отбора проб в помещениях лаборатории для микробиологического анализа.....	28
2.4 Порядок отбора проб и контроль культуры бактерий в процессе ферментации	28
2.5 Санитарно-микробиологический контроль воздуха	30
2.6 Санитарно-бактериологический контроль поверхностей оборудования и рук персонала методом смывов	30
2.7 Контроль микробной контаминации в процессе ферментации	31
3 Результаты исследования.....	33
3.1 Влияние уровня контаминации производственных помещений на чистоту бактериальной культуры в процессе ферментации.....	Ошибка!
Закладка не определена.	
3.2 Влияние обработки помещений дезинфектантами на обсемененность воздуха и поверхностей .	Ошибка! Закладка не определена.

3.3 Влияние озонирования на микрофлору воздуха помещений	Ошибка! Закладка не определена.
ВЫВОДЫ.....	33
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	35

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Микробиологический статус биотехнологического производства полигидроксиалканоатов» содержит 53 страниц текстового документа, 21 иллюстрацию, 6 таблиц и 5 источников.

Ключевые слова: микробиологический контроль, микробная контаминация, чистые помещения.

Целью настоящей работы было проведение микробиологического мониторинга биотехнологического производства полигидроксиалканоатов в Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ.

В задачи данного исследования входило: 1) Проведение микробиологического мониторинга помещений лаборатории: воздушной среды, поверхностей стен, технологического оборудования и рук персонала на разных стадиях ферментации. 2) Анализ чистоты бактериальной культуры *Cupriavidus eutrophus* на разных стадиях ферментации. 3) Оценка показателей микробной обсеменённости воздуха, поверхностей стен и оборудования до и после проведения обработки помещения с использованием дезинфектантов. 4) Выявление рисков микробной контаминации в процессе ферментации и способов их предотвращения.

Тема данной работы связана с одним из актуальных вопросов на сегодняшний день – это обеспечение микробиологического статуса биотехнологического производства ПГА на всех стадиях технологического процесса в соответствии с предъявляемыми к нему требованиями, что гарантирует выпуск готовой продукции высокого качества и исключает риск микробной контаминации. Проведенное исследование показало, что микробиологический мониторинг помещений, анализ культуры бактерий на каждой стадии биотехнологического процесса, а также обнаружение возможных источников контаминации и своевременное проведение

мероприятий по ее предотвращению являются основой в поддержании соответствующего требованиям микробиологического статуса биотехнологического производства ПГА.

ВВЕДЕНИЕ

На предприятиях биотехнологической промышленности для обеспечения гигиены и санитарии, а также с целью своевременного обнаружения микроорганизмов, которые могут являться контаминантами готовой продукции, необходимо проводить оценку количественного и качественного состава микроорганизмов воздуха помещений, в которых, по условиям технологии, требуется определенная степень чистоты [21].

Регулярная уборка помещений с использованием дезинфицирующих средств, а также различные методы по обеззараживанию воздуха имеют решающее значение для поддержания определенного уровня чистоты помещения. Несмотря на то, что в настоящее время существует множество подходов к очистке производственных помещений, проблема поиска наиболее эффективной комбинации методов очистки является актуальной [42,8].

В связи с вышеизложенным, целью данной работы являлось проведение микробиологического мониторинга биотехнологического производства полигидроксиалканоатов в Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести микробиологический мониторинг помещений лаборатории – воздушной среды, поверхностей стен, технологического оборудования и рук персонала на разных стадиях ферментации.
2. Провести анализ чистоты бактериальной культуры *Cupriavidus eutrophus* на разных стадиях ферментации.
3. Оценить показатели микробной обсемененности воздуха, поверхностях стен и оборудования до и после проведения обработки помещения с использованием дезинфицирующих средств.

4. Выявить риски микробной контаминации в процессе ферментации и способы их предотвращения.

1 Обзор литературы

1.1 Биологическая безопасность биотехнологических производств

К биотехнологическим производствам предъявляются различные требования к проблеме соблюдения асептики, как в процессе ферментации, так и используемой технологии. Выдвигаемые требования зависят от назначения получаемых конечных продуктов. Создание и реализация опытного биотехнологического производства требует решения ряда технологических задач, среди которых одно из существенных мест занимают вопросы микробиологии [24].

Одна из наиболее важных проблем любого биотехнологического производства – это риск микробной контаминации готовой продукции. К основным источникам контаминации относят персонал, воду и сырье, различные вспомогательные материалы, воздух, производственные помещения и оборудование, питательные среды, посевной материал и пеногаситель [22].

Любое биотехнологическое производство основано на использовании микробиологических процессов. Помещения для выработки готовой продукции часто не являются стерильными и поэтому благоприятны для развития микроорганизмов[12]. В закрытых помещениях воздух более обсеменен, чем атмосферный, в случае которого имеют место постоянные процессы самоочищения. Практически всегда в воздухе закрытых помещений можно обнаружить частицы пыли, содержащие не только неорганические соединения, но и различных микроорганизмов. Микроорганизмы воздушной сферы могут оказывать неблагоприятное действие на здоровье работающего в данных помещениях персонала. Кроме этого микроорганизмы могут выступать в роли контаминанта готовой

продукции, что может привести к изменению химических свойств продукта и, следовательно, механизма его действия [17].

Микробиологический анализ воздуха показывает, что микрофлора воздуха закрытых помещений имеет стабильный характер и представлена сапрофитными микроорганизмами, палочками, спорами плесневых грибов. Уровень микробного загрязнения воздуха зависит от санитарно-гигиенического состояния самого помещения, количества людей и их активности, а также наличия системы вентиляции [52]. Проблема биологического загрязнения воздуха закрытых помещений является актуальной, поэтому проведение оценки качества воздушной сферы – один из важных элементов микробиологического контроля производственных помещений [27]. Контроль содержания аэрозольных частиц в воздухе закрытых помещений проводят в соответствии с программой (обычно в эксплуатируемом состоянии чистого помещения) [53]. Программа включает: предварительно определенные точки пробоотбора, минимальный объем воздуха для каждой пробы, продолжительность отбора проб, число проб в каждой точке пробоотбора, интервал времени между отборами проб, размер (размеры) частиц, по которым ведется контроль, а также приемлемые пределы счета. Приборы, используемые для контроля, должны быть калиброваны или поверены в установленном порядке [9].

Периодичность контроля воздуха напрямую зависит от назначения контролируемого помещения, его места в технологической цепи каквозможного источника обсеменения продукта и обычно проводится 1 раз в месяц [23]. Следует учитывать, что если программой предусмотрены постоянный или частый мониторинг по концентрации аэрозольных частиц, то периодичность контроля концентрации частиц может быть увеличена [54]. Так, в настоящее время существует несколько типов мониторинга воздуха, выполняемых в эксплуатируемом помещении, в зависимости от периодичности: постоянный (выполняется непрерывно), частный (через определенные интервалы, не превышающие 60 мин.), один раз в 6, 12 или 24

месяца [11]. В том случае, если содержание нормируемой микрофлоры превышает допустимые значения, то воздух помещения подлежит обработке с целью снижения уровня его обсемененности. При проведении санитарно-микробиологического контроля воздуха обычно определяют общее микробное число (ОМЧ) и наличие санитарно-показательных микроорганизмов (таких как, например, бактерии *Staphylococcus aureus*) в 1 м³ воздуха. [28]. Кроме этого, на предприятиях микробиологической и биотехнологической промышленности определяют наличие микроорганизмов-продуцентов [23]

Оборудование, используемое в производстве – это один из важных элементов, определяющих качество выпускаемой продукции. Выбор оборудования следует осуществлять так, чтобы оно не представляло никакой опасности для продукции. В процессе работы оборудование не только не должно выделять загрязняющих веществ в окружающую среду, но и должно исключать возможность перекрестной контаминации продукции. Конструкции современного оборудования устроены так, чтобы свести к минимуму риск загрязнения. Это достигается при выполнении следующего: отсутствии «мертвых зон», недоступных для мойки, отсутствие смазок в зоне контакта с продуктами, использовании моющих средств с доказанной эффективностью. Так, например, большинство современного оборудования снабжено средствами очистки на месте и/или стерилизации на месте [6]. Качество мойки и дезинфекции контролируют непосредственно перед началом работы. Оборудование, не используемое после мойки больше 6 часов, подвергают вторичной обработке перед началом работы [13].

В процессе производства следует исключить риск перекрестного загрязнения, то есть загрязнения исходных материалов или продуктов другими материалами или продуктами. Возможность случайного перекрестного загрязнения возникает при условии неконтролируемого выделения пыли, газов, испарений и микроорганизмов из продуктов, а также от остаточных загрязнений на оборудовании и одежде персонала [6].

Суммарная величина перекрестного загрязнения складывается из следующих величин: непосредственного переноса (через контактирующие поверхности) и опосредованного переноса (через механические носители и через воздух). К ситуациям механического переноса относят процессы, когда активное вещество из одного процесса случайно, непреднамеренно поступает в другой посредством оборудования, одежды, бумаги и так далее. Такие объекты являются механическими переносчиками и менее предсказуемыми носителями кросс-контаминантов. Это связано с тем, что в данном случае человек является субъектом контаминации и, хотя его действия можно регулировать, реальную картину его поведения довольно сложно спрогнозировать. Кроме этого следует учитывать, что перекрестная контаминация посредством механического переноса – это случайная величина, что приводит к дополнительным трудностям при ее идентификации и контроле [7].

Контаминация, которая ассоциирована со взвешенными в воздухе частицами и захватом частиц с неконтактирующих поверхностей определяется как воздушный способ контаминации. Не смотря на повышенное внимание к данному способу контаминации, в настоящее время это не является большой проблемой [35]. Комплексные решения санитарии и гигиены труда на производстве, направленные на снижение концентрации загрязняющих веществ в воздухе, современная техника для очистки воздуха и конструкторские решения, применяемые при создании чистого помещения, изначально определяют высокую степень поддержания чистоты воздуха [10].

Часто персонал является источником обсеменения посторонней микрофлорой продукта в процессе его производства [46]. На руках часто обнаруживаются следующие виды микроорганизмов: *Staphilococcusepidermidis*, *S. aureus*, *Escherichiacoli*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Salmonella* и др. [13, 5]. Все эти микроорганизмы могут привести к изменению физико-химических свойств продукта, тем самым нанеся вред

здоровью потребителя. Поэтому важным является контроль соблюдения гигиены работниками предприятия, который проводят путем взятия смывов с поверхности рук. Гигиене персонала следует уделять внимание на всех этапах производства. К производству должны допускаться здоровые люди, без инфекционных заболеваний, регулярно проходящие медицинский осмотр [12]. Кроме этого, важным предметом, предотвращающим загрязнение продукта и самого технологического процесса, является одежда персонала. Основная функция одежды – барьерная, то есть защита от загрязнений, выделяемых человеком [43]. Выбор одежды главным образом зависит от класса чистоты помещения. В соответствии с этим основное требование, предъявляемое к одежде – сведение к минимуму загрязнения чистого помещения. Как правило, одежда должна полностью закрывать части тела, материал одежды должен действовать как фильтр, эффективно задерживая загрязнения, выделяемые персоналом, должен быть устойчивым к износу и повреждениям [34]

Таким образом, для того чтобы технологический процесс биотехнологического производства протекал нормально и на выходе получался качественный готовый продукт, необходимо строго соблюдать и контролировать санитарно-гигиеническое состояние производства, которое включает в себя контроль санитарии оборудования (смывы с оборудования, трубопроводов и пр.), гигиену персонала и контроль воздуха. Контроль санитарно-гигиенического состояния оборудования, инвентаря и гигиены персонала на предприятии должен проводить микробиолог без предупреждения в соответствии с программой микробиологического контроля производства и качества выпускаемой продукции [12]. Кроме этого, знание проблемы микробной контаминации на объектах производства и методов, используемых для ее предотвращения, также является необходимым условием для выпуска готовой продукции высокого качества и сведения к минимуму риска микробной контаминации готовой продукции [27].

1.2 Требования к чистым помещениям

Чистые помещения представляют собой контролируемые зоны, которые в сочетании с особенностями проектирования производственных помещений и инфраструктурой, создают пространство для выполнения асептических операций. Данные помещения включают в себя сложную комбинацию комнат и областей, в которых используются высокоэффективные HEPA-фильтры для создания однонаправленного воздушного потока [50].

Воздушный поток, подаваемый через HEPA-фильтры, должен иметь достаточно высокую скорость, чтобы переносить частицы от более критических областей к менее. Кроме этого, в чистых помещениях поддерживается избыточное давление, что предотвращает циркулирование микробных клеток от одной комнаты к другой [48]. Поэтому конструкция системы вентиляции, отопления и кондиционирования воздуха имеет большое значение в поддержании необходимого уровня микробной загрязненности воздуха чистых помещений. Данные системы имеют сложное строение и поддерживают нужную температуру и влажность, избыточное давление и воздухообмен в помещениях, что необходимо для поддержания асептических условий [56]. Важное условие нормального функционирования помещений данного типа – это проведение постоянного мониторинга чистоты помещения в соответствии с разработанной программой [37].

К материалам и конструкциям чистых помещений предъявляются отдельные требования. Используемые материалы должны позволять проводить необходимые процессы дезинфекции, не изменяя при этом свои свойства и состав. Поверхности должны быть гладкими, прочными, поддаваться легкой мойке (что исключает применение пористых материалов), стены, потолок и полы – непрерывными (отсутствие швов) [37].

К настоящему времени нет до конца разработанных и принятых нормативных документов, которые бы содержали ПДК бактериальной обсемененности воздуха закрытых помещений, а также нормативы по содержанию санитарно-показательных микроорганизмов. Поэтому данные документы должны разрабатываться индивидуально для каждого помещения, при этом следует учитывать тип данного помещения и его назначение[16]. Некоторые рекомендуемые санитарно-бактериологические показатели при микробиологическом анализе закрытых помещений приведены в таблицах 1, 2, 3, 4 и 5.

Так, в таблице 1 все помещения разделены на 4 класса чистоты в зависимости от количества микроорганизмов в этих помещениях. Данное разделение является условным.

Таблица 1 –Допустимые уровни бактериальной обсемененности воздушной среды чистых помещений в зависимости от их функционального назначения и класса чистоты [12]

Класс чистоты	Название помещения	Санитарно-микробиологические показатели			
		Общее кол-во микроорганизмов в 1м ³ воздуха, КОЕ/м ³		Кол-во плесневых и дрожжевых грибов в 1 дм ³ воздуха	
		До начала работы	Во время работы	До начала работы	Во время работы
Особо чистые (А)	Операционные, стерилизационная (чистая половина), боксы бактериологических лабораторий	Не более 200	Не более 200	Не должно быть	Не должно быть
Чистые (Б)	Процедурные, перевязочные, ассистентские и фасовочные аптек, помещения бактериологических и клинических лабораторий	Не более 500	Не более 750	Не должно быть	Не должно быть
Условно-чистые (В)	Палаты хирургических отделений, боксы и палаты инфекционных отделений, кладовые чистого белья	Не более 750	Не более 1000	Не должно быть	Не должно быть
Грязные (Г)	Коридоры и помещения административных зданий,	Не нормируется		Не нормируется	

Класс чистоты	Название помещения	Санитарно-микробиологические показатели			
		Общее кол-во микроорганизмов в 1м ³ воздуха, КОЕ/м ³		Кол-во плесневых и дрожжевых грибов в 1 дм ³ воздуха	
		До начала работы	Во время работы	До начала работы	Во время работы
	санитарные комнаты, туалеты, комнаты для грязного белья и временного хранения отходов				

Для чистого помещения важным показателем является уровень микогенной контаминации (см. табл. 2). Увеличению концентрации спор грибов в воздухе помещений способствует повышение влажности данного помещения, что может приводить к развитию заболеваний людей (в случае попадания спор в дыхательные пути человека), особенно важно это учитывать для людей, обладающим пониженным иммунитетом [5].

Таблица 2 – Уровень микогенной контаминации воздуха различных помещений [41]

Численность, КОЕ/м ³	Жилые помещения	Не индустриальные производственные помещения
Очень низкая	До 50	до 25
Низкая	50-200	25-100
Средняя	200-1000	100-500
Высокая	1000-10000	500-2000
Очень высокая	выше 10000	выше 2000

Чистые помещения и чистые зоны классифицируются в зависимости от микробной обсемененности воздуха. В таблице 3 приведено максимально допустимое количество частиц для каждого класса помещений [29]. Выделяют четыре класса чистоты закрытых помещений при производстве стерильных лекарственных средств: класс А – зоны, используемые для проведения операций с высокой степенью риска, например, наполнение емкостей в асептических условиях. Окружающую среду (фон) для класса А образуют помещения класса В. Такие классы

чистоты как С и D используются для выполнения операций с меньшей степенью риска[29].

Таблица 3 – Классификация чистых помещений и чистых зон [29]

Зона	Максимально допустимое число частиц в 1 м ³ воздуха при размере частиц, равном или большем следующих значений, мкм			
	В оснащённом состоянии		В эксплуатируемом состоянии	
	0,5 мкм	5,0 мкм	0,5 мкм	5,0 мкм
A	3 520	20	3 520	20
B	3 520	29	352 000	2 900
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000
D	3 520 000	29 000	Не регламентируется	Не регламентируется

Различные источники дают разные классификации классов чистоты помещений. Исходя из этого, следует отметить, что класс А соответствует классу ИСО 4.8 по показателю предельного количества частиц в воздухе размером 5,0 мкм. Класс В (в оснащённом состоянии) по количеству аэрозольных частиц соответствует классу ИСО 5 по количеству частиц обоих указанных размеров. Класс С по количеству аэрозольных частиц соответствует классу ИСО 7 и ИСО 8 соответственно (в оснащённом и эксплуатируемом состояниях). Класс D (в оснащённом состоянии) соответствует классу ИСО 8 по количеству аэрозольных частиц [29].

Таблица 4 – Классы чистоты по взвешенным в воздухе частицам для чистых помещений и чистых зон [32]

Класс N ИСО (N-классификационное число)	Максимально допустимые концентрации частиц, частиц/м ³ , с размерами, равными или большими следующих значений, мкм					
	0,1	0,2	0,3	0,5	1,0	5,0
Класс 1 ИСО	10	2	-	-	-	-

Класс 2 ИСО	100	24	10	4	-	-
Класс 3 ИСО	1000	237	102	35	8	-
Класс 4 ИСО	10000	2370	1020	352	83	-
Класс 5 ИСО	100000	23700	10200	3520	832	29
Класс 6 ИСО	1000000	237000	102000	35200	8320	293
Класс 7 ИСО	-	-	-	352000	83200	2930
Класс 8 ИСО	-	-	-	3520000	832000	29300
Класс 9 ИСО	-	-	-	35200000	8320000	293000

Таблица 5 – Рекомендуемые пределы при микробиологическом мониторинге чистых зон в эксплуатируемом состоянии [29]

Класс	Рекомендуемые пределы микробной контаминации (а)			
	В воздухе, КОЕ/м ³	Седиментация на чашку диаметром 90 мм, КОЕ за 4 ч (b)	Контактные пластины диаметром 55 мм, КОЕ/пластина	Отпечаток перчатки (5 пальцев), КОЕ/перчатка
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Примечание:
(а) Приведены средние значения
(б) Отдельные пластины для седиментации могут экспонироваться менее 4 часов.

Таким образом, чистые помещения должны быть спроектированы, построены и обслуживаться таким образом, чтобы свести к минимуму возможность загрязнения (как жизнеспособными клетками, так и другими загрязняющими агентами) всего производственного процесса, что будет гарантировать выпуск готового продукта высокого качества [37].

1.3 Способы микробиологического анализа воздуха

Оценка воздуха производственных помещений может проводиться по показателям общей бактериальной обсемененности. В то же время необходимо учитывать, что общее число микроорганизмов в определенном объеме воздуха имеет значение как относительный показатель чистоты воздуха [9]. Исследование микрофлоры воздуха закрытых помещений проводят различными методами [20].

Некоторые методы основаны на принципе ударно-пробивного действия воздушной струи. Применение данных методов связано с использованием специальных приборов, например аппарата Кротова. Суть метода заключается в следующем: проходя через узкую клиновидную щель, струя воздуха с большой скоростью ударяется о влажную поверхность питательной среды. При этом, ударяясь о поверхность среды, находящиеся в воздухе аэрозоли (пылевые частицы, содержащие бактерий, в том числе) прибиваются к поверхности среды. От 20 до 40 л/мин – производительность прибора Кротова[20].

Методы, при использовании которых воздух продувается через жидкость, носят название фильтрационных. Основан данный метод на улавливании бактерий в жидкости, которая после этого используется для посева на различные питательные среды. При использовании фильтрационных методов используется, например, прибор Дьяконова. Другие методы основаны на осаждении микробных клеток с помощью пара или распыленной жидкости, применяется прибор Речменского[20].

Наиболее распространенным способом является микробиологический анализ воздуха и устройство для его осуществления. Сущность данного метода заключается в следующем: исследуемый воздух пропускают через импактор с последующим инерционным разделением частиц, их осаждением на поверхность твердой питательной среды и подсчетом культивированных видимых колоний микроорганизмов. Невысокая точность анализа воздуха и сопоставимость результатов являются недостатками данного способа [25].

Следующий способ микробиологического исследования воздуха осуществляется путем пропускания воздуха через многокаскадный многосопловый импактор, подложки которого покрыты питательной средой, содержащей тест-культуру, с последующей инкубацией и определением концентрации и дисперсного состава антимикробных частиц. Особенностью метода является тот факт, что воздух пропускают через импактор перед внесением в питательную среду тест-культуры, причем последнюю пропускают через импактор в виде полидисперсного аэрозоля, а концентрацию и дисперсный состав антимикробных частиц определяют по числу невыросших колоний тест-культуры. В то же время недостаток данного способа - невысокая точность микробиологического анализа [10].

Не менее известным способом микробиологического анализа воздуха является осаждение микроорганизмов из воздуха на поверхность плотной питательной среды, далее происходит термостатирование осажденных микроорганизмов в течение суток и последующий подсчет выросших колоний. Во время термостатирования на осажденные микроорганизмы воздействуют переменным электрическим полем с напряженностью 75-150 В/см и частотой 50-100 Гц в течение 4-24 ч. Недостаток данного способа - выявить микроорганизмы, получившие сублетальные повреждения в результате пребывания в воздухе и воздействия таких факторов, как температура, относительная влажность и т.д. становится невозможно. Микроорганизмы, получившие повреждения, остаются жизнеспособными, но не образуют колонии в обычных условиях термостатирования [23].

Традиционный способ микробиологического анализа воздуха – это седиментационный метод (или метод Коха). Данный метод заключается в осаждении в открытые чашки Петри с плотной питательной средой микроорганизмов из воздуха под действием на них силы тяжести, термостатирование проб при 37°C и подсчете числа колоний микроорганизмов, выросших на поверхности. Однако недостаток данного способа - невысокая точность микробиологического анализа, за счет того, что

посев микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды осуществляют в процессе взятия пробы воздуха. При инкубировании некоторые бактериальные клетки, находящиеся на поверхности аэрозольных частиц, не контактируют полностью с питательной средой и остаются в «дремлющем» состоянии, не образуя при этом колоний, у других же образование видимых колоний не происходит в связи с тем, что количество питательного раствора, способного диффундировать в клетки, расположенные на поверхности аэрозольных частиц, ограничено, а их запасы в непосредственной близости быстро истощаются. Таким образом, в процессе определенная часть микроорганизмов не учитывается, что оказывает влияние на результат анализа [19].

К настоящему времени разработаны различные микробиологические методы обнаружения микроорганизмов в воздухе помещений. Они позволяют определить общее число бактерии в определенном объеме воздуха, а выделение бактерий при росте на питательных средах с последующим определением их биологических свойств традиционно остается основой идентификации патогенов. Вместе с тем, рекомендованные к применению методы не дают представления о полной картине циркулирующих в помещениях микроорганизмов [1].

1.4 Способы очистки воздуха и уборки помещений на производстве

В настоящее время разработаны различные методы, направленные на снижение микробной контаминации воздуха закрытых помещений. Условно их можно разделить на 2 типа: методы, которые не нуждаются в условиях прекращения технологического процесса и отсутствия людей, и методы, при использовании которых деконтаминация воздушной среды помещения возможна лишь при условии освобождения его от работающего персонала и изолировании от других помещений[42].

Первый тип включает в себя дезактивацию микробных клеток на поверхностях стен и оборудования, например, путем облучения помещения ультрафиолетовым (УФ) излучением. УФ-спектр можно разделить на части в зависимости от длины волны. Та часть спектра, которая используется в качестве бактерицидного средства для уничтожения находящихся в воздухе патогенов, находится в диапазоне от 240 до 320 нм (длина волны близка к пикам поглощения биологически значимых молекул - ДНК и белков). Кроме этого, важно учитывать такой параметр как поток излучения, плотность которого связана с количеством излучения на определенной длине волны, которое достигает поверхности патогенных микроорганизмов. Доза УФ-излучения, необходимого для эффективной борьбы с микроорганизмами воздушной сферы определяется сочетанием длины волны УФ-излучения, потока излучения и времени воздействия [44].

Согласно литературным данным антимикробное действие УФ-излучения основано на таких изменениях в ДНК микробных клеток как образование димеров азотистых оснований, после этого дальнейшая репликация ДНК прекращается, что приводит к гибели клеток [47].

Преимущество метода – отсутствие остаточного содержания в воздухе используемых реагентов, также применение УФ-излучения не приводит к образованию вредных или потенциально опасных для здоровья веществ. Недостатком данного метода является уменьшение с течением времени интенсивности УФ-излучения из-за износа ламп и некоторых внешних факторов, таких как оседающая на лампах пыль [49].

Одним из альтернативных методов очищения воздуха от микробных клеток является применение озона. Микробная инактивация путем озонирования – это сложный процесс. Озон способен атаковать различные компоненты клеточных мембран, клеточных стенок, цитоплазмы и оболочек эндоспор [51]. Известно, что озон обладает высокой окислительной активностью именно этим и обусловлено его бактерицидное действие:

дополнительный атом кислорода при взаимодействии с клетками микроорганизмов разрушает их путем окисления [45].

Следует учитывать, что дезинфекция воздуха с применением озона может быть проведена только в отсутствие людей в помещении, так как высокие концентрации озона опасны для здоровья человека [45]. Воздействие озона при низких концентрациях, около 0,1 мг/л, вызывает раздражение только глаз, горла и носа, тогда как уровни озона, достигающие 95 мг/л, могут иметь необратимые летальные последствия для людей. Исходя из этого, эффективные системы обнаружения и каталитического или термического разрушения озона - необходимое условие безопасности персонала на предприятиях (это особенно важно, если озон используется в газообразной форме) [51].

По мнению ученых, тщательная уборка и дезинфекция поверхностей помещений являются важными элементами программы по поддержанию заданного уровня чистоты чистых помещений [36]. Широкое применение нашли традиционные методы ручной уборки с применением хлорсодержащих дезинфицирующих средств. Хлор, проникая в клеточную мембрану бактерий, взаимодействует с белками, окисляет их, что приводит к гибели клетки. Низкая стоимость, удобство применения (хлорная кислота легко растворяется в воде) и высокий бактерицидный эффект обусловили широкое использование данные средства в медицинской и микробиологической промышленности. Однако данное средство имеет и недостатки: после растворения в воде дезинфектант становится нестабильным, потеря активного компонента может произойти под влиянием света, температуры или влаги. Последующие исследования показали наличие остаточного содержания дезинфицирующих средств на основе хлора на поверхностях, что приводит к сильному раздражению слизистых оболочек носа и горла людей. Кроме этого, применение хлорсодержащих дезинфектантов наносит серьезный ущерб окружающей среде [38].

Однако традиционные методы ручной очистки и дезинфекции на сегодняшний день являются не столь эффективными и часто неоптимальными, особенно для больших по площади помещений. Поэтому широкое применение нашли новые технологии «бесконтактного» (автоматизированного) обеззараживания поверхностей. Они включают в себя, например, применение аэрозольного пероксида водорода. В данных системах используется от 3 до 7% перекиси водорода, иногда с добавлением ионов серебра. Было показано, что применение данных систем приводит к снижению концентрации не только вегетативных клеток бактерий, но и спор на исследуемых поверхностях [36,39]. Одним из существенных преимуществ применения аэрозольного метода является способность аэрозоля проникать в труднодоступные места помещения, что способствует более экономичному использованию дезинфектанта за счет увеличения поверхности контакта средства с микроорганизмами. Кроме этого, образуются совершенно безопасные продукты распада – вода и кислород. Часто к недостаткам данного метода относят низкую производительность аппаратов аэрозольной дезинфекции [45, 55].

Таким образом, для достижения желаемой эффективности в дезинфекции поверхностей и воздушной среды традиционные методы очистки следует дополнять современными методами с применением новых современных дезинфицирующих средств с доказанной эффективностью [36].

1.5 Микробиологический синтез и области применения полигидроксиалканоатов

Среди большого разнообразия веществ, получаемых в биотехнологической промышленности, особого внимания заслуживают микробные термопластичные поли(3-оксиалканоаты) – полимеры 3-окси насыщенных жирных кислот. Среди них наиболее изученным считается полигидроксибутират – гомополимер D-(3)-оксимасляной кислоты, который

служит запасным энергетическим соединением. Данные биополимеры обладают механическими и физическими свойствами, близкими к полиэтилену и полипропилену, а также некоторыми специфическими свойствами, такими как биodeградируемость, биосовместимость и другими полезными свойствами [2].

Синтез полигидроксибутирата (ПГБ) осуществляют прокариоты в специфических условиях роста, при несбалансированном составе питательной среды; и эти полимеры являются резервными макромолекулами. Продуцентами ПГБ могут быть бактерии, принадлежащие к разным таксонам. Это природные штаммы представители родов *Cupriavidus* (ранее – *Alcaligenes*, *Ralstonia*), *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Methylotrophus*, а также рекомбинантные штаммы бактерий *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas oleovorans* др. [3]. Биосинтез ПГБ и его сополимеров может быть реализован в периодической культуре на разных субстратах: автотрофный рост на водороде или гетеротрофный – на углеводах, спиртах, органических кислотах, отходах пищевой промышленности (меласса, сыворотка), растительных маслах и пр. [3]. Наиболее высока вероятность контаминации при культивировании на углеводных субстратах – глюкозе и фруктозе, поэтому в условиях гетеротрофного роста необходим тщательный контроль на всех стадиях производства.

Повышенный интерес к полимерам биологического происхождения можно объяснить их широким разнообразием, уникальностью свойств, а также тем, что в отличие от традиционных химических методов биотехнологические методы позволяют получать экологически чистые материалы, не нанося тем самым вред окружающей среде [12].

Полигидроксиалканоаты нашли успешное применение в медицине, в частности, в хирургии в качестве прочного хирургического материала, способного рассасываться, как элементы для остеосинтеза и сосудистой пластики, в роли пленочных покрытий ран и ожоговых поверхностей;

фармакологии - лекарственные средства, обладающие пролонгированным действием[3]. За последние годы учеными были идентифицированы новые биополимеры этого класса - гетерополимеры, включающие мономеры 3-оксинасыщенных жирных кислот (оксимасяной, оксивалериановой, и др.) в различных соотношениях и вариантах. Полимеры такого типа обладают термопластичностью и биodeградируемостью. В настоящее время проводится активный поиск новых продуцентов биополимеров данного типа, проводятся опыты по оптимизации условий их ферментации, а также изучаются свойства материалов, полученных на их основе [11].

Особенно перспективным является применение ПГА в медицине в качестве контролируемых систем доставки лекарственных средств, матриц для клеточной и тканевой инженерии, элементов для трансплантологии и хирургии, нетканых и одноразовых изделий, а также шовных и перевязочных материалов[4].

Одна из актуальных проблем современной медицины – это проблема восстановления дефектов костной ткани. В последние годы для решения данной проблемы пытаются разработать и внедрить новые методики реконструктивных операций с использованием материалов, которые способны восполнять утраченный объем кости. В качестве наиболее перспективного материала для достижения поставленных целей выступают полигидроксиалканоаты. Данные микробные полимеры обладают рядом свойств, таких как биосовместимость, высокая прочность и медленная биodeградация, которые делают их одними из первых по значимости для применения в биомедицинских целях. Данный факт требует тщательного контроля биосинтеза ПГА и получения готового продукта на всех стадиях технологического процесса[28].

2 Методы исследования

2.1 Характеристика помещений Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ

В Сибирском федеральном университете (СФУ) находится Биомедицинский центр новых технологий, в котором расположено опытное производство полимеров микробного происхождения. На первом этаже центра располагается уникальная пилотная биотехнологическая линия биосинтеза целевых продуктов, новых биоматериалов и изделий биомедицинского назначения (рис. 1).

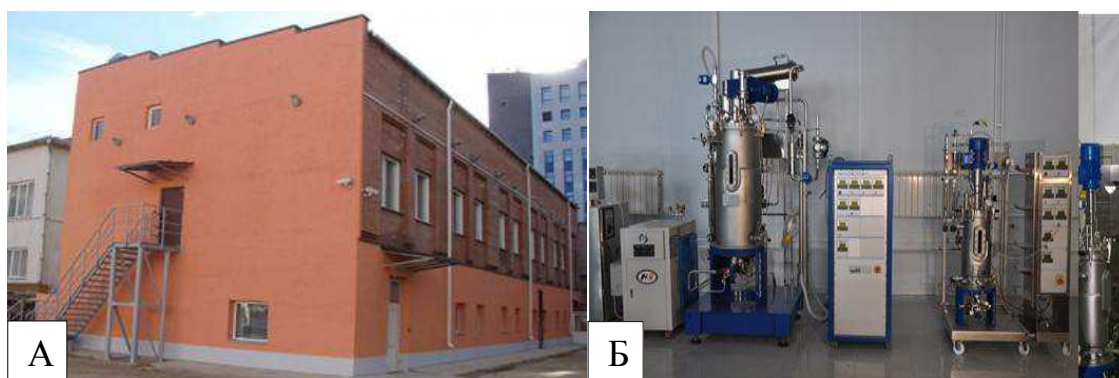


Рисунок 1 – Лаборатория биотехнологии новых биоматериалов СФУ: А – внешний вид здания лаборатории, Б – ферментационная линия

Обеспечение чистоты помещения происходит путем использования ограждающих конструкций с системой шлюзов для материалов и персонала и подготовкой вентиляционного воздуха класса чистоты Б по ГОСТ Р 52249-2009. В помещениях класса чистоты Б установлены ламинарные боксы, это

делает возможным выполнение критических операций с точки зрения чистоты продукта.

Поверхности стен и потолка гладкие, непроницаемые, легко подвергаются очистке и обработке дезинфицирующими средствами. Покрытие полов – полимерное. Двери распашные, дверное полотно и дверная коробка предусмотрены из высококачественного алюминиевого профиля. Конструкция дверей и покрытие из специальной порошковой краски обеспечивают устойчивость к дезинфицирующим средствам и УФ-облучению.

Воздух, подаваемый в помещения класса чистоты Б, проходит трехступенчатую систему очистки в соответствии с ГОСТ Р 51251-99:

- 1 ступень – фильтры класса F5;
- 2 ступень – фильтры класса F8;
- 3 ступень – фильтры класса H11.

2.2 Микробиологическое получение полигидроксиалканоатов в условиях Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ

Получение полигидроксиалканоатов проводится методом периодического культивирования бактерий вида *Cupriavidus utrophus*, на питательных средах с использованием различных органических веществ в качестве источников углерода (углеводы, спирты, жирные кислоты и пр.), и прекурсоров для биосинтеза полимеров разного химического состава согласно схеме (см. рис. 2).

Получение инокулята производится культивированием бактерий в колбах объемом 2 л на шейкере инкубаторе Innova 44 в течение 20 ± 2 ч при температуре плюс $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ до получения оптической плотности не менее 0,2. При достижении оптической плотности около 4 г/л происходит масштабирование процесса. Для этого необходимо произвести разбавление

культуры: разлить культуру с помощью стерильного мерного цилиндра на 500 мл в стерильные колбы объемом 2 л и разбавить полной средой Шлегеля в количестве 500 мл так, чтобы после разведения оптическая плотность в полученном инокуляте была не ниже 2 г/л. Колбы разместить в шейкере инкубаторе Innova 44, и цикл выращивания продолжить для достижения оптической плотности равной 5 г/л. Дальнейший процесс осуществляется в ферментерах. Полученный инокулят переносят в ферментер-инокулятор (Bioengineering NLF 22, общий объем 30 л) с целью получения необходимого объема для засева производственного аппарата. Полученный инокулят по стерильной посевной линии переносят в производственный ферментер (Bioengineering тип Р-сосуд, общий объем 150л).

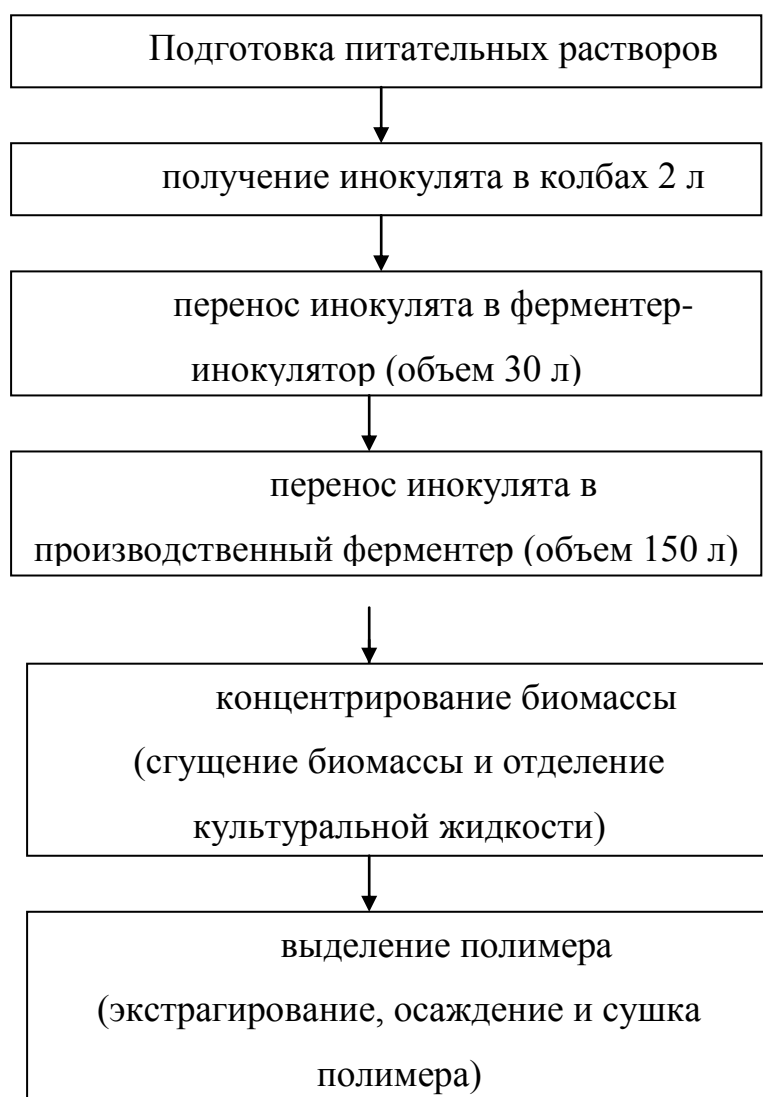


Рисунок 2 – Блок-схема получения ПГА

В зависимости от объема и скорости роста культуры процесс культивирования длится от 3 до 5 суток, после чего от культуральной жидкости отделяется биомасса методом центрифугирования, а затем экстрагируется полимер[14].

2.3 Порядок отбора проб в помещениях лаборатории для микробиологического анализа

Отбор проб проводится в специализированных помещениях опытного производства, расположенных на 1 этаже: отделение чистой (музейной) культуры, отделение средоподготовки, ферментационный зал, аппаратная комната, согласно разработанной ранее схеме (рис. 3).

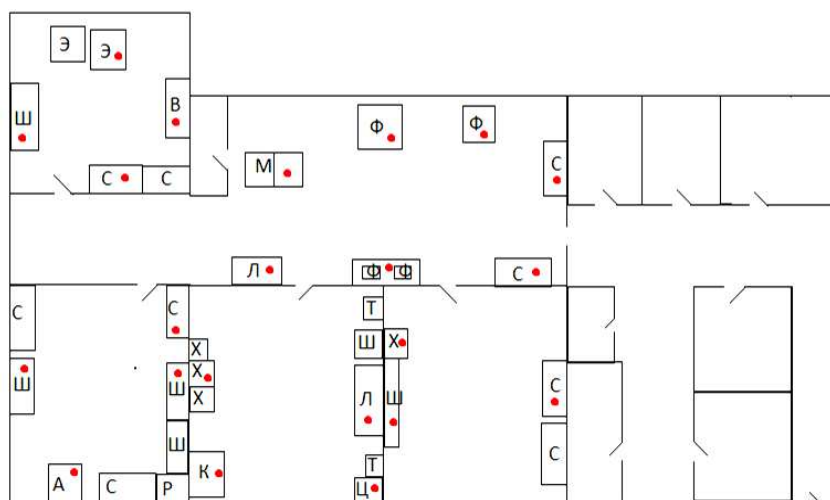


Рисунок 3 – Схема первого этажа Биомедицинского центра

Условные обозначения: Ш – шкаф; С – стол; Х – холодильник; Ф – ферментер; М – моечная машина; Л – ламинар; Т – тумбочка; Ц – центрифуга; К – качалка (шейкер); Р – раковина; А – автоклав; Э – экстрактор; В – вытяжной шкаф. Места отбора проб обозначены красными точками.

2.4 Порядок отбора проб и контроль культуры бактерий в процессе ферментации

Отбор пробы осуществляли на всех стадиях процесса ферментации согласно схеме (см. рис. 4). Первоначально проводили анализ культуры из колб перед перенесением инокулятора в ферментер-инокулятор. Следующий этап – анализ культуры в ферментере-инокуляторе перед пересевом в производственный ферментер. Дальнейший анализ проб проводили ежедневно в процессе ферментации. Конечный этап – анализ культуры по окончании процесса ферментации перед выгрузкой полученной биомассы.

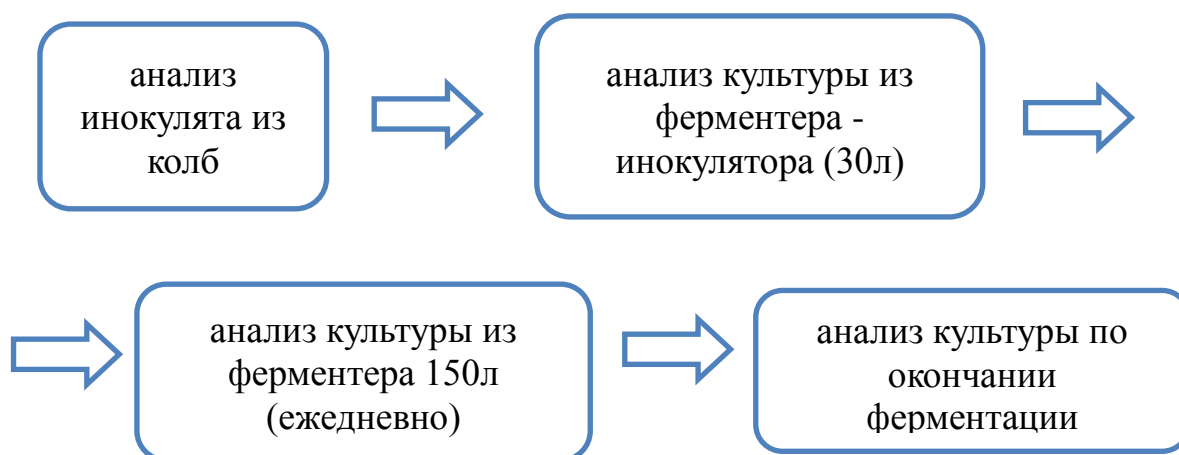


Рисунок 4 – Схема проведения микробиологического анализа чистоты культуры в процессе ферментации

Для проверки чистоты культуры на разных стадиях ферментации проводили высеивание культуры бактерий на мясопептонный агар. Отбор пробы производили асептически, в стерильные пробирки, в пламени спиртовки, предварительно дезинфицируя паром кран пробоотборника. Подсчет микроорганизмов проводили методом Коха.

Количество микроорганизмов в объектах внешней среды, как правило, велико, поэтому для получения отдельных колоний готовили разведения суспензии в стерильной водопроводной воде. В работе были использованы разведения 10^{11} – 10^{13} . Полученную суспензию в количестве 0,05 мл

переносили в чашки Петри. Этот объем стерильным шпателем распределяли по поверхности питательной среды. Из каждого разведения делали три параллельных посева. Чашки с посевами инкубировали при температуре 30 °С. Количественный учет микроорганизмов проводили на 3 сутки культивирования.

Анализ выросших колоний проводили стандартными методами микробиологии [11, 18]. Идентификация бактериальных изолятов была основана на сравнительном анализе их морфологических и культуральных свойств. Определяли морфологию вегетативных клеток, спорообразование, подвижность. Грампринадлежность изучаемых культур определяли экспресс-методом Грезерсона.

2.5 Санитарно-микробиологический контроль воздуха

Анализ микрофлоры воздуха проводили седиментационным методом на агаризованных питательных средах: для учета бактерий использовали мясопептонный агар (МПА) (Nutrient Agar, HiMedia), для учета дрожжевых и плесневых грибов - агар Сабуро (Sabouraud Dextrose Agar, HiMedia). Для этого чашки Петри с застывшим МПА или агаром Сабуро выставляли в открытом виде на разных высотах на 30 минут, после чего их закрывали и помещали в термостат. Чашки с МПА инкубировали в течение 3-х суток при температуре 30 °С. Чашки с агаром Сабуро инкубировали при 25 °С в течение 7-и суток. Подсчет количества выросших колоний проводили после 3-7 суток инкубации. Затем производили пересчет обсемененности воздуха микроорганизмами на 1 м³ по формуле:

$$X = \frac{(N \times 100)}{63,6} \times 100,$$

где X – обсемененность воздуха, КОЕ/м³

N – количество выросших колоний на чашке [15].

Далее проводили качественный анализ микрофлоры воздуха: производили описание колоний по внешним признакам и микроскопирование отдельных колоний [15].

2.6 Санитарно-бактериологический контроль поверхностей оборудования и рук персонала методом смывов

Взятие проб производили с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов, которые предварительно помещали в лабораторные стаканы с добавлением 2 мл водопроводной воды и стерилизовали автоклавированием. Смывы с поверхностей стен и оборудования брали с площади 100 см². Посев осуществляли методом штриха на МПА для выращивания бактерий и на агар Сабуро для выращивания дрожжевых и плесневых грибов.

При взятии смывов с рук стерильным ватным тампоном протирали ладонные поверхности обеих рук (проводили не менее 5 раз по каждой ладони и пальцам), затем протирали межпальцевые пространства, ногти и подногтевые пространства. Посев производили на агар Эндо(Endo Agar, HiMedia).

Бактерии инкубировали 3 суток при 30 °С. Грибы инкубировали 7 суток при 25 °С. После инкубирования проводили учет выросших колоний и пересчитывали на площадь поверхности 1 см². Посев на агар Эндо инкубировали 1 сутки при 37 °С.

Далее проводили качественный анализ: производили описание колоний по внешним признакам и микроскопирование отдельных колоний [11].

2.7 Контроль микробной контаминации в процессе ферментации

Источниками микробной контаминации могут быть входящие в ферментеры потоки инокулята, продуваемого воздуха и питательных сред.

Наличие контаминации в инокуляте определяли, как описано в п. 2.4. Определение стерильности компонентов питательной среды – источников углерода и азота – проводили после стерилизации, перед добавлением в культуру. Проверляли стерильность растворов глюкозы, мочевины и глицерина методом высева на питательный агар 0,5 мл раствора без разведений. Контаминацию воздуха для аэрации культуры проверяли после прохождения фильтров, направляя поток воздуха, поступающего в ферментер, на чашку Петри с питательным агаром.

Посевы на стерильность инкубировали в термостате при 30 °С в течение 3-5 суток, контролировали рост или отсутствие роста колоний посторонней микрофлоры.

3Результаты исследования

Изъято 13 страниц

ВЫВОДЫ

1. Проведен микробиологический контроль воздушной среды, поверхностей стен и оборудования лаборатории по производству полигидроксиалканоатов. Результаты микробиологического контроля помещений лаборатории свидетельствуют об их соответствии по показателям ПДК микробной обсемененности помещениям, отнесенным к классу чистоты Б.

2. Анализ чистоты культуры бактерий *Cupriavidus eutrophus* показал наличие минорных концентраций бактерии-контаминанта по окончании процесса культивирования, которая не обнаруживалась на объектах внешней среды и в воздухе.

3. Обработка помещения с использованием в качестве дезинфицирующего средства аламинола снижала микробную обсемененность поверхностей стен и оборудования в 2-4 раза ниже исходных значений. Концентрация микроорганизмов на поверхностях оставалась в пределах нормы на протяжении 3 суток после обработки.

4. Анализ микрофлоры воздуха показал снижение концентрации микроорганизмов после обработки помещения аламинолом. Однако максимальная степень чистоты воздух была выявлена после озонирования

5. В качестве рекомендаций для предотвращения и ликвидации микробной контаминации следует выделить следующие: для очистки воздушной среды помещений применять озонатор («Озон-90П»), для очистки поверхностей стен и оборудования использовать метод «3 ведер» с применением в качестве дезинфицирующего средства аламинола.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Бадамшина, Г. Г. Оптимизация методов, рекомендованных для оценки состояния внутрибольничной среды / Г. Г. Бадамшина // Медицинский альманах. – 2017. – №. 4. – С. 60–62.
- 2 Волова, Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения РАН, 1999. – 252 с.
- 3 Волова, Т. Г. Полиоксикалкоанаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т. Г. Волова, В. И. Севостьянов, Е. И. Шишаккая. – Новосибирск: Издательство СО РАН, 2003. – 330 с.
- 4 Волова Т. Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалкалоанатов / Т. Г. Волова. – 2014.
- 5 Воробьев, А. А. Медицинская и санитарная микробиология: учебн. пособие для высш. мед. учебн. зав. / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Ширококов. М.: Академия, 2003. - 464 с.
- 6 Гармонов, С. Ю. Перекрестное загрязнение в химико-фармацевтическом производстве: проблемы стандартизации и унификации требований / С. Ю. Гармонов // Вестник Казанского технологического университета. – 2006. – №. 6.
- 7 Гой, А. М. Совмещение и выделение производств готовых лекарственных форм. Риски и выгоды. / А. М. Гой, Г. В. Костюк, Р. А. Смишко // Фармацевтическая отрасль: промышленное обозрение, -2009. - № 6.
- 8 Градова, Н. Б. Биологическая безопасность биотехнологических производств : учебное пособие / Н.Б. Градова, Е.С. Бабусенко, В.И. Панфилов. - М.: ДеЛи принт, 2010. - 136 с.
- 9 Дмитриев А. Ф., Морозов В. Ю. Исследование микробной обсемененности воздуха животноводческих помещений. / А. Ф. Дмитриев, В. Ю. Морозов. Ставрополь : Издательство «АГРУС», 2005. – 28 с.

- 10 Дмитриев, А. Ф. Прибор для улавливания микроорганизмов : информ. листок № 63-026-04 / А. Ф. Дмитриев, В. Ю. Морозов, Ю. В. Краснощекова // ЦНТИ. – Ставрополь, 2004. – 3 с.
- 11 Елдышев, Ю. Н. Современная биотехнология: мифы и реальность / Ю. Н. Елдышев. – М. : Тайдекс Ко, 2004. – 196 с.
- 12 Иркитова, А. Н. Санитарно-гигиенический контроль при производстве сыров. / А. Н. Иркитова, Е. Ф. Отт // Сыроделие и маслоделие. – Москва : АНО «Молочная промышленность», 2012. - №2. – С. 44-45.
- 13 Канунникова, Е. Гигиена персонала. / Е. Канунникова // Переработка молока. – Москва : Отраслевые ведомости. – 2011. - №2. – С. 52-53.
- 14 Киселев, Е. Г., Демиденко А. В., Барановский С. В., Волова Т. Г. Масштабирование технологии синтеза биodeградируемых полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства / Е. Г. Киселев, А. В. Демиденко, С. В. Барановский, Т. Г. Волова // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2014. – Т. 7. - №2. – С. 134-147
- 15 Кузина, О. В. Микробиологические методы исследования объектов окружающей среды : учебное пособие для вузов / О. В. Кузина, О. Н. Смирнова. – Нижний Новгород : 2013.
- 16 Лабинская, А. С., Волина Е. Г. Руководство по медицинской микробиологии / А. С. Лабинская, Е. Г. Волина. - Москва : БИНОМ, 2008. – 1080 с.
- 17 Литвенкова, И. А., Строгая А. Г. Сезонная динамика микробиологических показателей воздушной среды рабочей зоны предприятия ЗАО "Агрокомбинат "Заря"" / И. А. Литвенкова, А. Г. Строгая. – 2014.
- 18 Морозов, В. Ю., Дмитриев А. Ф. Устройство для контроля воздушной среды по микробиологическим показателям / В. Ю. Морозов, А. Ф. Дмитриев // Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. - 2012. - Т. 3. – №. 1-1.
- 19 Несвижская, И. И. и др. Дезинфекционные технологии для обеззараживания воздуха в лечебно-профилактических учреждениях

- //Український журнал екстремальної медицини імені ГО Можаява. – 2011. – №. 12, № 3. – С. 19-22.
- 20 Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов. -Москва : "Академия", 2005. – 608 с.
- 21 Рыбаков, С. С., Курс лекций по основам биотехнологии. В 2 ч. Ч. 2. Применение биотехнологии. Владим. гос. ун-т. – Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2010. – 127 с.
- 22 Рымовская, М. В. Основы промышленной асептики: электронный курс лекций для студентов / М. В. Рымовская. - Минск: БГТУ, 2018. – 128 с.
- 23 Свириденко Г. М. Микробиологический контроль санитарно-гигиенического состояния производства. / Г. М. Свириденко // Переработка молока. – Москва : Отраслевые ведомости. – 2010. - №8. – С. 6-8.
- 24 Стасишина, Г. Н. Микробиологические исследования ферментации водородных бактерий *AlcaligenesEutrophusZ-I* в условиях опытного производства / Г. Н. Стасишина, И. М. Панькова, Я. В. Федорова, Ф. Я. Сидько. - Красноярск, Институт биофизики СО АН СССР, 1989. - 25 с.
- 25 Трухачев, В. И. Способ микробиологического анализа воздуха / В. И. Трухачев // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – №. 108.
- 26 Хоулт, Дж. Определитель бактерий Берджи. б.м. : Мир, - 1997.
- 27 Шагинурова, Г. И. Техническая микробиология: Учебно-методическое пособие / Г. И. Шагинурова, Е. В. Перушкина, К. Г. Ипполитов. – Казан. гос. технол. ун-т, Казань, 2010. – 123 с.
- 28 Шумилова, А. А., Шишацкая Е. И. Материалы для восстановления костной ткани / А. А. Шумилова, Е. И. Шишацкая. – 2014.
- 29 Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 N 916 "Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств" (Зарегистрировано в Минюсте России 10.09.2013 N 29938)
- 30 ГОСТ Р 51251-99 Фильтры очистки воздуха. Классификация. Маркировка. – Введ. 01.01.2000. – Москва : ИПК Издательство стандартов, 1991.

- 31 ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств. – Введ. 01.01.2010. – Москва : Стандартинформ, 2009.
- 32 ГОСТ Р 14644-1-2002 Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 1. Классификация чистоты воздуха. – Введ. 01.04.2004. - Москва: Стандартинформ, 2002.
- 33 ГОСТ Р ИСО 14644-2-2001. Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 2. Требования к контролю и мониторингу для подтверждения постоянного соответствия ГОСТ Р ИСО 14644-1-2000. – Введ. 01. 01. 2003. - Москва: Госстандарт России, 2001
- 34 ГОСТ Р ИСО 14644-5-2005 Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 5. Эксплуатация. – Введ. . – Москва: Стандартинформ, 2005.
- 35 Alum, E. A. Microbiological contamination of food: the mechanisms, impacts and prevention / E. A. Alum, S. Urom, C. M. A. Ben // Int. J. Sci. Technol. Res. – 2016. – Т. 5. – №. 3. – С. 65-78.
- 36 Boyce, J. M. Modern technologies for improving cleaning and disinfection of environmental surfaces in hospitals / J. M. Boyce // Antimicrobial Resistance & Infection Control. – 2016. – Т. 5. – №. 1. – С. 10.
- 37 Burton, S. L. Comparison of cleanroom and isolator aseptic processing technology for small start-up parenteral facilities / S. L. Burton. – University of Georgia, 2016.
- 38 Cheng, C. Effect Comparison of Double-stranded Quaternary Disinfectant Wipes and Chlorine Disinfectant of Sterilizing the Surface of the Operating Room / C. Cheng, A. Jiang, C. Cheng. – 2018.
- 39 Coles, T. Sanitisation with vapour phase hydrogen peroxide–practical cycle development and future improvements / T. Coles // Clean Air and Containment Rev. – Т. 29. 2017.
- 40 Dao, H. Microbial stability of pharmaceutical and cosmetic products / H. Dao //AAPS PharmSciTech. – 2018. – Т. 19. – №. 1. – С. 60-78.

- 41 De Hoog G. S. Atlas of clinical fungi, CentraalbureauvoorSchimmelcultures / G. De Hoog // Universitat Rovirai Virgili. – 2000.
- 42 Doll, M. Environmental cleaning and disinfection of patient areas / M. Doll, M. Stevens, G. Bearman // International Journal of Infectious Diseases. – 2018.
- 43 Hu, S. C. Validation and application of the personnel factor for the garment used in cleanrooms / S. C. Hu, A. Shiue // Building and Environment. – 2016. – T. 97. – C. 88-95.
- 44 Krosney, M. D.. Air sterilization and disinfection method / M. D. Krosney, W. E. Reisenauer. – USA. – 2016.
- 45 Larsen J. K. Method of disinfecting one or more surfaces and/or sterilizing air, and an apparatus for use in the method / J. K. Larsen. – USA – 2016.
- 46 Mauri, S. Lowering the risk of personnel induced contamination: The use of robotics in aseptic processing / S. Mauri // Clean Air and Containment Review. – 2017.
- 47 Neister, S. E. Method and apparatus for sterilizing and disinfecting air and surfaces and protecting a zone from external microbial contamination / S. E. Neister, J. J. Rowsey. – USA. – 2017.
- 48 Romano, F. Performance test of technical cleanroom clothing systems / F. Romano // Indoor Air 2016. – 2016. – C. 1-8.
- 49 Sandle, T. Risk of microbial spores to cleanrooms: Part 2: Selection of sporicidal disinfectants / T. Sandle // Clean Air and Containment Rev. – 2017. – T. 29. – C. 14-16.
- 50 Tršan, M. The environmental monitoring in hospital pharmacy cleanroom and microbiota catalogue preparation / M. Tršan, K. Seme, S. Srčić // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2019.
- 51 Varga, L. Use of ozone in the dairy industry: a review / L. Varga, J. Szigeti // International Journal of Dairy Technology. – 2016. – T. 69. – №. 2. – C. 157-168.
- 52 Vijayakumar, R. A review of melanized (black) fungal contamination in pharmaceutical products—incidence, drug recall and control measures / R.

Vijayakumar, M. Saleh Al- Aboody, T. Sandle // Journal of applied microbiology. – 2016. – T. 120. – №. 4. – C. 831-841.

53 Whyte, W. Airborne particle deposition in cleanrooms: Calculation of product contamination and required cleanroom class / W. Whyte // Clean Air and Containment Review. – 2016. – T. 26. – C. 4-10.

54 Whyte, W. Calculation of air supply rates and concentrations of airborne contamination in non-UDAF cleanrooms / W. Whyte // European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences. – 2017. – T. 22. – №. 4. – C. 126-138.

55 Zhang, S. The effect of two disinfection methods on the surface disinfection of objects around the bed unit [J] / S. Zhang, L. Feng, M. Li // Chinese Journal of Disinfection, 2015, C. 91-92.

56 Zhou, L. Studies on Comparison of Particle Concentration Models for Cleanroom / L. Zhou //Procedia Engineering. – 2017. – T. 205. – C. 3308-3315.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

«5» мая 2019 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Микробиологический статус биотехнологического
производства полигидроксиалканоатов

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель


подпись, дата

проф., д-р биол. наук
должность, ученая степень


С. В. Прудникова
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

Е. А. Соложенникова
инициалы, фамилия

Рецензент


подпись, дата

доцент, к. биол. наук

С. Ю. Евграфова
инициалы, фамилия

Красноярск 2019