

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Т. Г. Волова

« 19 » июня 2017 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА**

Руководитель С. В. Прудникова профессор, д-р биол. наук  
подпись, дата 19.06.17

Выпускник М. Д. Матвеева  
подпись, дата

Красноярск 2017

## Содержание

Введение.....	3
1. Обзор литературы .....	4
1.1. Контроль качества биотехнологических процессов на предприятиях микробиологических производств .....	4
1.2. Требования к чистым помещениям.....	6
1.3. Очистка и обеззараживание воздуха, поверхностей стен и оборудования .....	10
1.4. Анализ микрофлоры воздуха.....	11
1.5. Санитарно – бактериологическое исследование поверхностей оборудования и рук персонала .....	12
1.6. Микробиологический контроль бактериальной культуры на этапах производства.....	13
2. Объекты и методы исследования .....	15
2.1. Общая характеристика Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов .....	15
2.2. Порядок отбора проб для микробиологического анализа ...	16
2.3. Контроль микрофлоры воздуха.....	17
2.4. Санитарно – бактериологический контроль поверхностей оборудования и рук персонала .....	17
2.5. Контроль культуры в процессе ферментации.....	18
3. Результаты исследования.....	19
Выводы.....	20
Список литературы .....	21
Приложения .....	25

## Введение

Основные принципы обеспечения качества и контроля качества взаимосвязаны и имеют первостепенное значение в организации биотехнологического производства. Обеспечение качества является комплексной задачей, решение которой требует реализации всех мер, направленных на достижение заданных требований. При этом контроль качества включает в себя отбор проб, проведение испытаний (анализов) и оформление соответствующей документации [5].

В основных требованиях существует такое положение, как «Предотвращение перекрестного загрязнения». Культивируемые микроорганизмы могут быть загрязнены другими микроорганизмами, моющими или дезинфицирующими средствами, частицами пыли и др. Во многих случаях при культивировании используется одно и то же оборудование. Поэтому для предотвращения контаминации каждой последующей культуры предыдущей очень важным является проведение эффективной процедуры очистки оборудования [5].

Чистые помещения являются показателем высоких технологий производства и обеспечения качества. Нужно так построить технологию и организацию производства, чтобы невозможно было выпустить продукцию низкого качества и надежности. Это принципиальная основа современного подхода к обеспечению качества. Важной частью его является технология чистоты [17, 28, 30]. Чистые технологии относятся к наиболее современным и прогрессивным отраслям науки и техники, пользующихся в передовых странах серьезной государственной поддержкой. В России наблюдаются положительные сдвиги в распространении понимания важности этой проблемы, создаются серьезные предпосылки формирования полноценной отрасли промышленности чистых помещений [29].

В связи с этим целью настоящей работы было проведение микробиологического контроля биотехнологического производства в Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов.

Были поставлены следующие задачи:

1. Проведение микробиологического контроля помещений первого этажа лаборатории – воздушной среды, поверхностей стен, технологического оборудования и рук персонала.
2. Проведение анализа чистоты бактериальной культуры *Cupriavidus eutrophus* на разных стадиях ферментации.

# 1. Обзор литературы

## *1.1. Контроль качества биотехнологических процессов на предприятиях микробиологических производств*

В настоящее время производственные процессы, основанные на жизнедеятельности микроорганизмов, приобрели огромное значение. Современная биотехнология прямо или косвенно связана с генной инженерией — созданием новых форм микроорганизмов путем непосредственного изменения их генетической системы для получения высокоэффективных полезных штаммов, что влечет за собой увеличение разнообразия биотехнологической продукции [33].

Достижение превосходства в биотехнологии — одна из важных задач в экономической политике промышленных государств. Возможно, что в XXI веке биотехнология окажет решающее воздействие на решение таких важных проблем, как охрана здоровья, обеспечение человека продовольствием, охрана окружающей природы и энергообеспечение [1].

Один из путей решения такой проблемы связан с качеством биотехнологических процессов — направленным регулированием хода биотехнологических, физико-химических и микробиологических процессов [33].

Чистота помещений является важным фактором, обеспечивающим производство качественного целевого продукта. Существует несколько загрязняющих факторов, которые влияют на производство продукта [5]:

- биологические микроорганизмы;
- аэрозольные частицы;
- химические загрязнения.

Производство нестерильных форм должно осуществляться в помещениях классов чистоты С и D. Важно учитывать, что в этих помещениях предусматривается нормирование содержания жизнеспособных микроорганизмов в воздухе. Нормирование содержания механических частиц не предусматривается [7].

Следует исключить возможность перекрестного загрязнения. Для предотвращения перекрестного загрязнения следует предусмотреть следующие технические и организационные меры [2]:

- организация воздушных шлюзов и вытяжных устройств;

- сведение к минимуму риска контаминации, вызываемого рециркуляцией или повторным поступлением необработанного или недостаточно обработанного воздуха;

- применение методик очистки и деконтаминации с известной эффективностью.

Оборудование, применяемое для производства целевого продукта, является критическим элементом, определяющим качество выпускаемой продукции. Проведение валидации очистки оборудования включает в себя следующие этапы [5]:

- проведение процесса очистки оборудования;
- отбор проб;
- передача проб в химическую и микробиологическую лаборатории отдела контроля качества;
- заполнение протокола валидации;
- анализ полученных результатов и сравнение их с критериями приемлемости;
- составление отчета о валидации.

Отбор проб проводится после окончания процесса очистки и сушки оборудования. При проведении процесса валидации очистки оборудования, оно должно быть проверено на наличие остатков получаемого продукта, вспомогательных веществ, моющих средств [27].

Согласно требованиям GMP, формализованные процессы представляют собой основу, необходимую для организации надлежащего производства продукции на предприятиях микробиологических производств [7, 20], поэтому внедрение в практику системы управления документацией и записями, обеспечивающей достаточность информации для проведения работ, анализов результатов и своевременной актуализации процессов производства, позволяет руководству предприятия своевременно решать вопросы, связанные с качеством продукции [9].

Надежным способом обеспечения биобезопасности биотехнологических производств является организация производства с соблюдением правил асептики, которые направлены на [8]:

- предотвращение попадания посторонней микрофлоры в технологический процесс, что обеспечивает эффективность технологии и получение продукта требуемого качества;
- предотвращение попадания культивируемого биологического объекта с воздушными выбросами и техногенными потоками в окружающую среду.

Асептические условия производства обеспечиваются специальным оборудованием и технологией. Проникновение в реакционный объем ферментера даже одного постороннего микроорганизма означает нарушение технологического режима и может привести к получению некондиционного продукта, но некоторые процессы допускают небольшое количество посторонней микрофлоры [8].

Предотвращение проникновения посторонней микрофлоры в процесс обеспечивается [8]:

- стерилизацией воздуха, питательной среды и всех поступающих потоков;
- стерилизацией оборудования и коммуникаций;
- герметичностью оборудования;
- использованием специальных методов и приборов для отбора проб и контроля;
- поддержанием асептических условий в течение процесса культивирования.

## **1.2. Требования к чистым помещениям**

При оценке санитарного состояния закрытых помещений в зависимости от задач исследования определяют общее микробное число, наличие санитарно-показательных микроорганизмов (стафилококков,  $\alpha$ - и  $\beta$ -гемолитических стрептококков, грамотрицательных условно-патогенных бактерий) [18, 16]. На предприятиях микробиологической промышленности проводят исследование на наличие микроорганизмов-продуцентов (*Candida* – на гидролизно-дрожжевых заводах и заводах по производству БВК; *Aspergillus* и споровые бактерии – на ферментных заводах; *Bacillus thuringiensis* и сальмонеллы – при производстве бактериальных средств защиты растений и борьбы с грызунами).

Выделение тех или иных патогенных или условно-патогенных микроорганизмов из воздуха проводят на специальных дифференциально-диагностических средах [16]: среда Эндо (для выделения *Escherichia coli*), кровяной агар (для выращивания патогенных бактерий), хромогенный колиформный агар (для выращивания колиформных бактерий) [31], агар Сабуро (для выращивания дрожжевых и плесневых грибов).

В чистых зонах должны отсутствовать споры дрожжевых и плесневых грибов. Споры плесневых грибов могут быть обнаружены при повышенной влажности в помещении. Грибы р. *Aspergillus* вызывают аспергиллезы, р.

*Penicillium* – пенициллезы, р. *Mucor* – зигомикозы при попадании спор в дыхательные пути. Это особенно опасно для людей с пониженным иммунитетом [19].

Нормативы бактериальной обсемененности и содержания санитарно-показательных микроорганизмов в воздухе закрытых помещений до конца не разработаны. Они должны разрабатываться с учетом типа и назначения помещений [16]. Некоторые санитарно-бактериологические показатели, рекомендуемые при исследовании воздуха таких помещений, приведены в таблицах 1, 2, 3, 4, 5.

Таблица 1 – Допустимые уровни бактериальной обсемененности воздушной среды чистых помещений в зависимости от их функционального назначения и класса чистоты [31]

Класс чистоты	Название помещения	Санитарно-микробиологические показатели			
		Общее кол-во микроорганизмов в 1м <sup>3</sup> воздуха, КОЕ/м <sup>3</sup>		Кол-во плесневых и дрожжевых грибов в 1 дм <sup>3</sup> 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, предназначенные для проведения исследований	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, санитарные комнаты, туалеты, комнаты для грязного белья и временного хранения отходов	Не нормируется		Не нормируется	

Таблица 2 – Уровень микогенной контаминации воздуха различных помещений [37]

Численность, КОЕ/м <sup>3</sup>	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. Подтверждение класса чистоты необходимо четко отделять от мониторинга производственной среды при проведении процесса. Максимально допустимая концентрация аэрозольных частиц для каждого класса приведена в таблице 3 [23, 25].

Для производства стерильных лекарственных средств выделяют четыре класса чистоты помещений. Тип А – локальные зоны для операций с высокой степенью риска, например, наполнение, укупоривание емкостей, вскрытие ампул и смешивание в асептических условиях. Класс В образует окружающую среду (фон) для зоны класса А. Классы С и D используются для выполнения менее критических операций [23, 25].

Таблица 3 – Классификация чистых помещений и чистых зон [23, 25]

Зона	Максимально допустимое число частиц в 1 м <sup>3</sup> воздуха при размере частиц, равном или большем			
	В оснащённом состоянии		В эксплуатируемом состоянии	
	0,5 мкм	5,0 мкм	0,5 мкм	5,0 мкм
А	3 520	20	3 520	20
В	3 520	29	352 000	2 900
С	352 000	2 900	3 520 000	29 000
Д	3 520 000	29 000	Не регламентируется	Не регламентируется

Для целей классификации в зонах класса А минимальный объем отбираемой пробы воздуха должен быть не менее 1 м<sup>3</sup> для каждой точки отбора проб. 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 (в оснащённом и



эксплуатируемом состоянии) по количеству аэрозольных частиц соответствует классу ИСО 7 и ИСО 8 соответственно. Класс D (в оснащённом состоянии) по количеству аэрозольных частиц соответствует классу ИСО 8 [23].

Таблица 4 – Классы чистоты по взвешенным в воздухе частицам для чистых помещений и чистых зон [6]

Класс N ИСО (N - классификационное число)	Максимально допустимые концентрации частиц, частиц/м <sup>3</sup> , 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 [23, 25, 36]

Класс	Рекомендуемые пределы микробной контаминации (а)			
	В воздухе, КОЕ/м <sup>3</sup>	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

(b) Отдельные пластины для седиментации могут экспонироваться менее 4 часов.

### ***1.3. Очистка и обеззараживание воздуха, поверхностей стен и оборудования***

В чистых помещениях необходимо контролировать и регулировать уровень загрязнения воздуха [11]. Современное качество немислимо без чистоты производственной среды [13].

В закрытых помещениях существуют различные методы дезинфекции. Основными методами обеззараживания воздуха и поверхностей являются: механический, физический и химический [35].

Для обработки масштабных помещений с большим количеством поверхностей и оборудования высокоэффективным химическим методом дезинфекции является аэрозольный метод. Суть аэрозольного метода дезинфекции заключается в насыщении воздуха герметично закрытого помещения частицами аэрозоля-дезинфектанта [35]. Частицы, находящиеся во взвешенном состоянии, контактируют с воздухом и всеми поверхностями в помещении, обеззараживая их. Важную роль в аэрозольной дезинфекции играет диаметр витающих в воздухе частиц, содержащих дезинфицирующее средство. Площадь поверхности, покрываемая при распылении 1 грамма аэрозоля с дисперсностью 10 мкм, составляет 6000 см<sup>2</sup>, а при дисперсности в 1 мкм – 60000 см<sup>2</sup> [38]. В дезинфекции производственных поверхностей используют жидкие дезинфицирующие препараты (сулема, карболовая кислота, диоксид хлора, формалин, каустическая сода, аламинол и др.) [8]. Диоксид хлора нарушает клеточный метаболизм микробов, реагируя непосредственно с аминокислотами и РНК в клетке [35]. Он является в 10 раз более эффективным дезинфектантом, чем хлор и хлорсодержащие дезинфектанты [14]. Основные методы дезинфекции – обмывание, орошение, протирание смоченной ветошью и т. д. [8].

Также (УФ) бактерицидное излучение является действенным профилактическим санитарно-эпидемическим средством, которое эффективно подавляет жизнеспособность бактерий в воздушном и доступном для облучения поверхностях предметов. Поэтому ультрафиолетовое излучение широко используется в установках обеззараживания воздуха, воды и поверхностей [12, 32].

Метод ультрафиолетового обеззараживания является физическим, безреагентным методом, который лишен главных недостатков физических методов дезинфекции – отсутствие остаточного содержания реагентов, невозможности непрерывного использования реагентов для обработки помещений, объектов в присутствии людей. УФ метод не вызывает

остаточных эффектов при обеззараживании воздуха, не приводит к созданию вредных потенциально опасных веществ, не изменяет органолептических свойств. Он позволяет уничтожать вирусы и грибки, на которые не действуют традиционные химические методы, в частности хлорирование. При использовании УФ метода отсутствует передозировка и не возникает отрицательный эффект [34].

Антимикробное действие УФ излучения проявляется в деструктивно-модифицирующих повреждениях ДНК в клеточном ядре микроорганизмов, что приводит к гибели микробной клетки в первом или последующих поколениях [34].

Бактерицидные облучатели для обеззараживания воздуха делятся на три группы: открытые (настенные, напольные и потолочные), закрытые и комбинированные. В открытых облучателях бактерицидный поток от лампы и отражателя охватывает широкую зону в пространстве, вплоть до телесного угла. В открытых комбинированных облучателях конструктивной особенностью является поворотный экран (отражатель), который направляет поток излучения в необходимую зону пространства. В данном случае обеззараживания осуществляется прямым и отраженным УФ излучением. Установки для обеззараживания воздуха открытого типа можно использовать только в отсутствии людей.

В закрытых облучателях (рециркуляторы) бактерицидный поток от лампы распределяется в ограниченном пространстве и не имеет выхода наружу. Обеззараживание воздуха осуществляется в процессе его прохождения через рециркулятор. Закрытые облучатели (рециркуляторы) предназначены для обеззараживания воздуха производственных помещений, помещений общественного питания, торговли и другие, где нужно поддерживать чистоту воздуха [34].

#### ***1.4. Анализ микрофлоры воздуха***

Атмосферный воздух и воздух закрытых помещений значительно различаются по количественному и качественному составу микроорганизмов. Бактериальная обсемененность помещений выше плотности бактерий в атмосферном воздухе, в том числе и патогенными видами, попадающими в воздух от больных людей [22].

Для исследования микрофлоры используют различные методы [22].

*Седиментационный метод (метод Коха, 1881г)* – основан на оседании бактериальных частиц и капель под действием силы тяжести на поверхности

питательной среды открытой чашки Петри [22]. Чашки Петри со средой расставляют в разных местах и открывают на определенное время (10-30 мин), после чего инкубируют и выявляют видовую принадлежность. Затем определяют общее микробное число (ОМЧ). При исследовании воздуха на содержание бактерий используют мясопептонный агар (МПА), а при исследовании грибов - агар Сабуро [4, 15, 26].

*Фильтрационный метод (воздух продувается через жидкость)* – основан на улавливании бактерий в жидкости, которая затем может быть использована для посева на различные среды – прибор Дьяконова (1925 г.) (Приложение 1) [22].

*Методы, основанные на осаждении микробных аэрозолей паром или распыленной жидкостью,* – прибор Речменского (Приложение 1) [22].

*Методы, основанные на принципе ударно-пробивного действия воздушной струи* с использованием специальных приборов, например, прибора Кротова (1951г) (Приложение 1). Струя воздуха приходит через узкую клиновидную щель и с большой скоростью ударяется о влажную поверхность питательной среды. В результате удара находящиеся в воздухе аэрозоли, в том числе содержащие бактерии пылевые частицы и капли, прибиваются к поверхности МПА или элективных сред. Производительность такого прибора составляет 20-40 л/мин. Подобные методы наиболее надежны и точны [22].

В производственных помещениях необходимо периодически проверять анализ общей обсемененности окружающей среды. Для этого проводится анализ чистоты воздуха методами, представленными выше.

### ***1.5. Санитарно – бактериологическое исследование поверхностей оборудования и рук персонала***

Изучение бактериальной загрязненности рук и различных предметов производится в целях оценки санитарно-гигиенического состояния исследуемого объекта, установления путей распространения инфекции при эпидемиологических заболеваниях, лабораторного контроля эффективности обработки кожи рук [22]. В зависимости от цели проводимого исследования и характера контролируемых объектов в полученных смывах определяют: общую микробную обсемененность (обычно с пересчетом на 1 см<sup>2</sup> исследуемой поверхности); наличие бактерий группы кишечной палочки, как показателей фекального загрязнения; наличие патогенных бактерий кишечной группы, обнаружение которых является безусловным показателем

эпидемического неблагополучия; наличие стафилококков и других микроорганизмов [22].

Смывы с оборудования и инвентаря производят перед началом работы или после санитарной обработки в санитарные дни.

Смывы с рук следует производить перед началом работы и после пользования туалетом.

Смывы производят с помощью стерильных увлажненных тампонов или салфеток. Стерильные ватные тампоны на стеклянных или металлических палочках, вмонтированные в пробирки с ватными пробками, заготавливают заранее в лаборатории. В день взятия смывов в каждую пробирку с тампоном наливают по 2 мл стерильной воды так, чтобы ватный тампон не касался ее поверхности. При проведении последующих микробиологических посевов на жидких средах вместо воды в пробирки можно заливать соответствующую питательную среду. Непосредственно перед взятием смыва тампон увлажняют средой [3].

Смывы с крупного оборудования и инвентаря берут с поверхности 100 см<sup>2</sup>. Для ограничения поверхности используется шаблон (трафарет из проволоки или металлической пластинки), стерилизуемый перед каждым новым смывом путем обжига на пламени горелки. Трафарет имеет площадь 25 см<sup>2</sup> и для получения площади в 100 см<sup>2</sup> его накладывают на 4 разных участка исследуемого предмета. Ограниченные трафаретом поверхности тщательно протирают увлажненным тампоном во взаимно перекрещивающихся направлениях [3].

При исследовании рук смывы делают с ладонных поверхностей (проводя по каждой ладони не менее 5 раз), пальцев, ногтей, межпальцевых и подногтевых пространств [3].

Существуют рекомендуемые пределы при микробиологическом мониторинге чистых зон методом смывов с поверхностей в эксплуатируемом состоянии. В критической зоне количество жизнеспособных колоний не должно превышать 2 КОЕ/см<sup>2</sup>, а в некритической зоне допустимое количество жизнеспособных колоний не должно превышать 5 КОЕ/см<sup>2</sup> [11].

### ***1.6. Микробиологический контроль бактериальной культуры на этапах производства***

Важным фактором контроля любого биотехнологического процесса, протекающего с участием микроорганизма-продуцента, является

микробиологический контроль в ходе ферментации. Микробный синтез включает в себя несколько этапов для производства целевого продукта [8]:

- подготовка посевного материала (инокулята);
- приготовление питательной среды для культивирования биообъекта;
- культивирование (выращивание) биообъекта;
- получение целевого продукта.

Вначале проводится микробиологический анализ инокулята, который получается при наращивании биомассы бактерий из музейной культуры. Затем, если культура чистая, ее концентрируют методом центрифугирования и загружают в ферментер. Далее посев культуры из ферментера проводится ежедневно до окончания процесса ферментации.

Отбор пробы производится асептически, в стерильные пробирки, в пламени спиртовки, предварительно дезинфицируя паром кран пробоотборника.

## 2. Объекты и методы исследования

### 2.1. Общая характеристика Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов

В Биомедицинском центре СФУ расположена Лаборатория биотехнологии новых биоматериалов, в которой скооперировано производство полимеров и медицинских изделий на основе полимеров микробного происхождения, способных к деградации. На первом этаже располагается пилотная биотехнологическая линия по получению экологически чистого биоразрушаемого термопластичного полимерного материала (рисунок 1).



Рисунок 1 - Внешний вид здания лаборатории и ферментационная линия

Ограждающие конструкции с системой шлюзов для материалов и персонала, подготовка вентиляционного воздуха класса чистоты D по ГОСТ Р 52249-2009 обеспечивают чистоту помещений.

В чистых зонах класса А предусмотрено выполнение критических операций с точки зрения чистоты продукта – это обеспечивается ламинарными боксами, установленными в помещениях класса D. Поверхности стен и потолка гладкие, непроницаемые, легко подвергаются очистке и обработке дезинфицирующими средствами. Двери распашные; дверное полотно и дверная коробка предусмотрены из высококачественного алюминиевого профиля. Устойчивость к дезинфицирующим средствам и УФ-облучению обеспечивают конструкция дверей и покрытие из специальной порошковой краски. Покрытие полов – полимерное.

Очистка воздуха, подаваемого в помещения класса чистоты D, трехступенчатая в соответствии с ГОСТ Р 51251-99(EN 779):

- 1 ступень – фильтры класса F 5;
- 2 ступень – фильтры класса F8;
- 3 ступень – фильтры класса H11.

## 2.2. Порядок отбора проб для микробиологического анализа

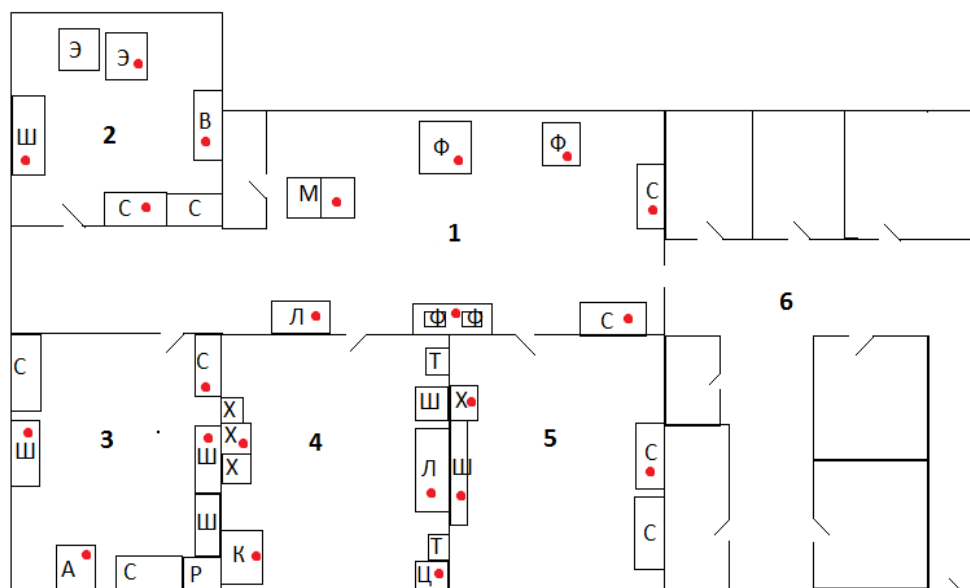


Рисунок 2 – Схема первого этажа Лаборатории биотехнологии новых материалов

Условные обозначения: 1 – ферментационная комната; 2 – экстракторная комната; 3 – автоклавная комната; 4 – музейная комната; 5 – комната аппаратчиков; 6 – технологические помещения; 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.

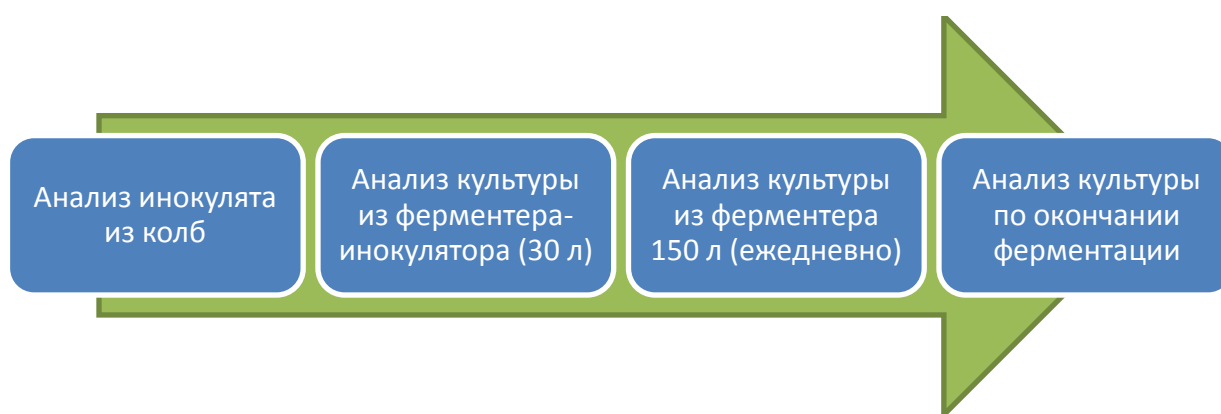


Рисунок 3 – Схема проведения микробиологического анализа чистоты культуры в процессе ферментации



### **2.3. Контроль микрофлоры воздуха**

Анализ микрофлоры воздуха проводили седиментационным методом на агаризованных питательных средах: МПА (Nutrient Agar, HiMedia) для учета бактерий и Сабуро (Sabouraud Dextrose Agar, HiMedia) для учета дрожжевых и плесневых грибов. Для этого чашки Петри с застывшим МПА или агаром Сабуро оставляли открытыми на разных высотах на 30 минут, после чего их закрыли и поместили в термостат. Чашки с МПА культивировали в течение 3-х суток при температуре 30 °С. Чашки с агаром Сабуро культивировали при 25 °С в течение 7-и суток. После 3-7 суток подсчитывали количество колоний. Затем проводили пересчет обсемененности воздуха бактериями или спорами грибов на 1 м<sup>3</sup> по формуле:

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

где  $X$  – обсемененность воздуха, КОЕ/м<sup>3</sup>

$N$  – количество выросших колоний на чашке [36].

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

### **2.4. Санитарно – бактериологический контроль поверхностей оборудования и рук персонала**

Смывы производили с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов. Смывы с поверхностей стен и оборудования брали с площади 100 см<sup>2</sup>. Посев делали штрихом на МПА для выращивания бактерий и на агар Сабуро для выращивания дрожжевых и плесневых грибов.

При исследовании рук смывы делали с ладонных поверхностей, пальцев, ногтей, межпальцевых и подногтевых пространств. Посев делали на хромогенный колиформный агар (Chromogenic Coliform 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 см<sup>2</sup>.

Далее проводили качественный анализ: описание колоний по внешним признакам и микроскопирование отдельных колоний.

## ***2.5. Контроль культуры в процессе ферментации***

Для проверки чистоты культуры в ферментере проводили высеv на мясопептонный агар.

Отбор проб осуществляли асептически в стерильную пробирку.

Подсчет микроорганизмов проводили методом Коха.

Так как количество микроорганизмов в объектах внешней среды, как правило, велико, то для получения отдельных колоний готовили разведения суспензии в стерильной водопроводной воде. В работе были использованы разведения  $10^{-11}$  –  $10^{-13}$ . Делали посев в чашки Петри в количестве 0,05 мл суспензии. Этот объем распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Из каждого разведения делали три параллельных высева. Чашки с посевами выдерживали при температуре 30 °С. Количественный учет микроорганизмов проводили на 3-10 сутки культивирования.

Анализ выросших колоний проводили стандартными микробиологическими методами [22, 24]. При идентификации бактериальных изолятов проводили сравнительный анализ их морфологических, культуральных свойств. Определяли морфологию вегетативных клеток, спорообразование, подвижность. Принадлежность изучаемых культур к группе грамположительных или грамотрицательных бактерий определяли экспресс-методом Греггерсона.

### 3. Результаты исследования

В Лаборатории биотехнологии новых материалов ведутся разработки высокотехнологичной продукции на основе разрушаемых биополимеров (ПГА), биосинтез которых осуществляется штаммами хемотрофных бактерий *Cupriavidus eutrophus*.

Для достижения получения качественного продукта был проведен микробиологический контроль производства: перед началом культивирования были проведены микробиологические анализы микрофлоры воздуха и поверхностей стен и оборудования, исследовано соответствие помещений Лаборатории биотехнологии новых материалов классу чистоты D по GMP и было запущено культивирование бактерий *Cupriavidus eutrophus*, для микробиологического контроля проводился посев культуры из ферментера ежедневно до окончания процесса ферментации. Отбор пробы производился асептически, в стерильные пробирки, в пламени спиртовки, предварительно дезинфицируя паром кран пробоотборника.

[Изъято 18 страниц]

## Выводы

1. Микробиологический анализ поверхностей стен и технологического оборудования биотехнологической лаборатории показал, что микробная контаминация была в пределах допустимых значений.
2. При микробиологическом анализе рук персонала не было обнаружено санитарно-показательных микроорганизмов.
3. Контроль чистоты бактериальной культуры *Cupriavidus eutrophus* выявил в некоторых случаях контаминацию посторонней микрофлорой на последней стадии ферментационного процесса (3,7% и 18,9%).
4. Выявление и устранение причины микробной контаминации воздуха позволило привести помещения биотехнологического производства в соответствие нормам класса чистоты D по GMP, а также устранить контаминацию посторонней микрофлорой в процессе ферментации.

## Список литературы

1. Антипова, Л. В. Методы исследования мяса и мясных продуктов : учеб. пособие / Л. В. Антипова, И. А. Глотова, И. А. Рогов – Москва : КолосС, 2004. – 376 с.
2. Балицкий, Ю. Контроль контаминации – технология мирового уровня [Электронный ресурс] / Ю. Балицкий, С. Н. Бабенко // Сайт надлежащей производственной практики. – Режим доступа: <http://www.gmpua.com>
3. Бацукова, Н.Л. Микробиологический контроль за качеством пищевых продуктов и санитарным режимом на пищевых предприятиях : учеб. пособие / Н. Л. Бацукова, Н. В. Борушко, П. Г. Новиков – Минск : БГМУ, 2011. – 35 с.
4. Воробьев, А. А. Медицинская и санитарная микробиология : учеб. пособие / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Ширококов. – Москва : Академия, 2009. - 464 с.
5. Гармонов, С. Ю. Перекрестное загрязнение в химико-фармацевтическом производстве: проблемы стандартизации и унификации требований / С. Ю. Гармонов // Вестник Казанского технологического университета. – 2006. – №. 6. – С. 294 – 305.
6. ГОСТ Р 14644-1-2002 Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. – Введ. 01.04.2004. – Москва: Стандартинформ, 2004. – 20 с.
7. ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств. – Введ. 01.01.2010 – Москва: Стандартинформ, 2010. – 132 с.
8. Градова, Н. Б. Биологическая безопасность биотехнологических производств : учеб. пособие / Н. Б. Градова, Е. С. Бабусенко, В. И. Панфилов. – Москва : ДеЛи принт., 2010. – 135 с.
9. Дьяконова, Е. В. Принципы организации системы документов СМК на предприятии производителе лекарственных средств / Е. В. Дьяконова // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26, №. 2-2. – С. 100 – 102.
10. Желтикова, Т. М. К вопросу о допустимом уровне микромицетов в воздухе помещений / Т. М. Желтикова // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11. – №. 2. – С. 41-43.
11. Закотей, М. Технология чистых помещений в фармацевтическом производстве / М. Закотей // Фарматека. – 2001. - №5. – С. 25 – 28.

- 12.Иваненко, А. В. Московская целевая программа по измерению ультрафиолетового бактерицидного излучения / А. В. Иваненко, С. Г. Сафонкина, Л. А. Саушкина // Светотехника. - 2004. – №4 – С. 2 – 5.
- 13.Калечиц, В.Н. Чистое помещение – чистое лекарство / В. Н. Калечиц // Технология чистоты. – 2002. – №4. – С. 11 – 14.
- 14.Кожевников, А. Б. Для тех, кому не нравится хлор [Электронный ресурс] / А. Б. Кожевников, О. П. Петросян // Стройпрофиль. – 2004. – Режим доступа: <http://stroyprofile.com/archive/1265>
- 15.Кузина, О. В. Микробиологические методы исследования объектов окружающей среды : методические указания к лабораторным занятиям / О. В. Кузина, О. Н. Смирнова. – Нижний Новгород : Нижегородский государственный технический университет, 2013. – 14 с.
- 16.Лабинская, А. С. Руководство по медицинской микробиологии : учеб. пособие / А. С. Лабинская, Е. Г. Волина – Москва : БИНОМ, 2008. – 1080 с.
- 17.Литовченко, В. Г. Аттестация чистых помещений / В. Г. Литовченко // Чистые помещения и технологические среды. – 2004. – № 3. – С.38-40.
- 18.Микробиология с основами вирусологии : лабораторный практикум / С. В. Прудникова, Н. Д. Сорокин, Н. И. Сарматова, Н. И. Реммель, Г. А. Выдрякова. – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – 151 с.
- 19.МУ 44-116 Асептическое производство медицинских иммунобиологических препаратов. – Введ. 19.05.1997. – Москва : Департамент госсанэпиднадзора Минздрава РФ, 1997. – 60 с.
- 20.МУ 64-04-002-2002 Производство лекарственных средств. Введ 15.04.2003 – Москва : ГипроНИИмедпром, 2003. – 18 с.
- 21.Научный центр HIMEDIA [Электронный ресурс] : информация о готовых питательных средах // компания Himedia Laboratories Pvt Ltd – Москва, 2017. – Режим доступа : <http://www.himedialabs.ru/m1300> .
- 22.Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии : лаб. практикум / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук – Москва : Академия, 2005. – 608 с.
- 23.Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств [Электронный ресурс] : Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 N 916. – Режим доступа: [http://minpromtorg.gov.ru/common/upload/files/docs/Prikaz\\_Minpromtorga\\_Rossii\\_ot\\_14.06.2013\\_N\\_916.rtf](http://minpromtorg.gov.ru/common/upload/files/docs/Prikaz_Minpromtorga_Rossii_ot_14.06.2013_N_916.rtf)

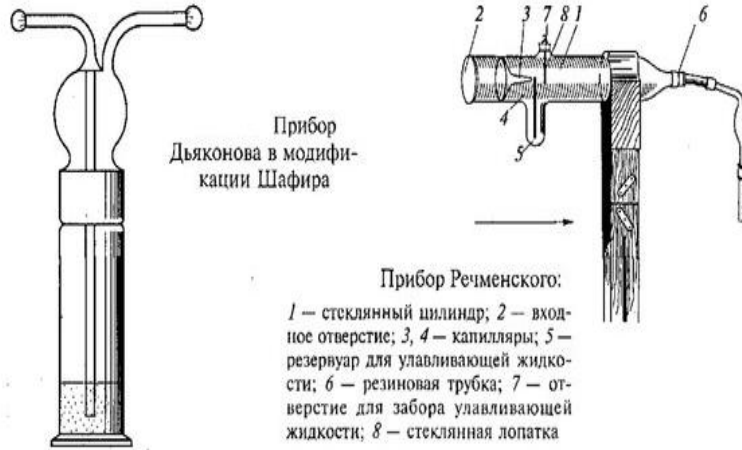
24. Определитель бактерий Берджи : учеб. пособие / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса ; пер. с англ. под ред. Г. А. Заварзина – 9-е изд. перераб. и доп. – Москва : Мир, 1997. – 422 с.
25. Павелек, З. Курс GMP и чистые помещения [Электронный ресурс] / З. Павелек, И. Монинец // Сайт надлежащей производственной практики. – 2004. – Режим доступа: [http://www.gmpua.com/CleanRoom/Design/GMP\\_AND\\_CleanRooms.pdf](http://www.gmpua.com/CleanRoom/Design/GMP_AND_CleanRooms.pdf)
26. Поздеев, О. К. Медицинская Микробиология : учеб. пособие / О. К. Поздеев ; под. ред. В. И. Покровского – Москва: ГОЭТАР- Медиа, 2010. - 768 с.
27. Попов, А. Р. Дезинфекция чистых помещений // Современные требования. Чистые помещения и технологические среды. – 2003. – Т. 4. – С. 38-40.
28. Попов, А. Ю. Как наиболее эффективно соответствовать требованиям GMP? / А. Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. – 2005. – №1. – С. 9 – 10.
29. Попов, А. Ю. Повышение эффективности перехода российских предприятий к работе в соответствии с правилами GMP / А. Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. – 2003. – №1. – С. 5 – 6.
30. Попов, А. Ю. Система анализов рисков. Как соответствовать требованиям GMP / А. Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. – 2004. – №. 4. – С. 17.
31. СанПиН 2.1.3.1375-03 Гигиенические требования к размещению, устройству, оборудованию и эксплуатации больниц, родильных домов и других лечебных стационаров. – Введ. 1.07.2007. – Москва : Российская газета, 2007.
32. Сениор, Д. Бутилированная вода: типы, состав, нормативы : монография / под ред. Д. Сениор, Н. Деге ; пер. с англ. под ред. Е. Боровиковой, Т. Зверевич. – Санкт-Петербург : Профессия, 2006 – 424 с.
33. Соловьева, А. А. Актуальные биотехнологические решения в мясной промышленности / А. А. Соловьева // Молодой ученый. – 2013. – №. 52. – С. 105-107.
34. Семенов, А. А. Источники ультрафиолетового излучения для бактерицидного обеззараживания воды и воздуха/ А. А. Семенов, Л. В. Берлинова, Н. В. Семенова //Сборник научных трудов SWorld. – 2014. – №. 2. – С. 44-49.
35. Шматкова, Э. Б. Применение аэрозольного метода дезинфекции в комплексе профилактических и противоэпидемических мероприятий в

- медицинских организациях [Электронный ресурс] / Э.Б. Шматкова, Л.С. Федорова, А.Ю. Скопин, В.Г. Акимкин // ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора [сайт]/ - Режим доступа: [http://niid.ru/s/210/files/press/release/125445\\_480.pdf](http://niid.ru/s/210/files/press/release/125445_480.pdf)
36. Auterhoff, G. EC Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products : book / G. Auterhoff. – Aulendorf : Editio-Centor-Verl, 2002. – 300 p.
37. Harris, James L. Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures / James L. Harris // Mycopathologia. – 2000. - №3. – P. 159 – 160.
38. Lighthart, B. Atmospheric microbial aerosols: theory and applications : book / B. Lighthart, A. J. Mohr – New York : Springer Science & Business Media, 2012. – 397 с.
39. Muller, J. Requirements for establishing a country-wide diagnostic service in medical mycology / J. Muller // International Society for Human and Animal Mycology – 13 Congress, Salsomaggiore Terme, Parma, Italy, 1997.– P.8 – 13.



# Приложения

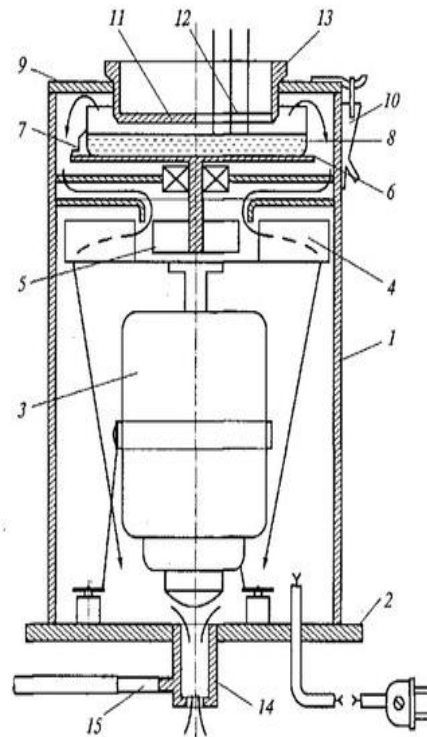
## Приложение 1



Прибор  
Дьяконова в модифи-  
кации Шафира

Прибор Речменского:

1 — стеклянный цилиндр; 2 — входное отверстие; 3, 4 — капилляры; 5 — резервуар для улавливающей жидкости; 6 — резиновая трубка; 7 — отверстие для забора улавливающей жидкости; 8 — стеклянная лопатка



Аппарат Кротова:

1 — цилиндрический корпус; 2 — основание корпуса; 3 — электромотор; 4 — центробежный лентильятор; 5 — восьмилопастная крыльчатка; 6 — диск; 7 — пружины; 8 — чашка Петри; 9 — крышка прибора; 10 — накидные замки; 11 — диски из плексигласа; 12 — клиновидная щель; 13 — разрезное кольцо; 14 — штуцер с диафрагмой; 15 — выводная трубка