

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т.Г. Волова

«__» _____ 2022 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Микробиологический контроль при производстве биоразрушаемых
полимеров – 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>М. Д. Скрипник</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>канд. биол. наук</u>	<u>А.В. Муруева</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия

Красноярск 2022

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Микробиологический контроль при производстве биоразрушаемых полимеров – полигидроксиалканоатов» содержит 62 страницы текстового документа, 16 иллюстраций, 15 таблиц, 1 приложение, 84 использованных источника.

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

Целью настоящей работы было проведение микробиологического мониторинга биотехнологического процесса на примере технологии получения микробного полимера – поли(3-гидроксибутирата) (П(ЗГБ)), реализуемой в Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ (далее – Лаборатории).

В задачи исследования входило: 1) Проведение микробиологического мониторинга и оценка степени микробной контаминации помещений Лаборатории – воздушной среды, поверхностей стен, технологического оборудования; 2) Оценка влияния озонирования и обработки дезинфектантами на обсемененность воздушной среды и поверхностей оборудования Лаборатории; 3) Проведение анализа жизнеспособности и чистоты биомассы бактериальной культуры штамма-продуцента *Cupriavidus eutrophus* на разных сроках хранения; 4) Влияние длительного хранения на содержание П(ЗГБ) в биомассе бактериальной культуры *Cupriavidus eutrophus*; 5) Разработка рекомендаций для проведения микробиологического мониторинга биотехнологического производства

Тема данного исследования связана с актуальным, на сегодняшний день, направлением – обеспечение микробиологического статуса биотехнологического производства полигидроксиалканоатов на всех стадиях технологического процесса, что гарантирует получение готовой продукции высокого качества и предотвращает микробную контаминацию.

Исследования показали, что микробиологический контроль помещений лаборатории, анализ бактериальной культуры на всех стадиях технологического процесса, а также выявление потенциальных источников микробной контаминации, разработка и своевременное проведение мероприятий по ее предотвращению служат фундаментом для обеспечения микробиологического статуса биотехнологического производства полигидроксиалканоатов.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1. Мониторинг качества биотехнологических производств.....	8
1.2. Требования к чистым помещениям.....	12
1.3. Методы очистки и дезинфекции воздушной среды, поверхностей стен и технологического оборудования на производстве	17
1.4. Методы анализа микрофлоры воздуха	20
1.5. Санитарно-бактериологическое исследование поверхностей технологического оборудования	22
1.6. Микробиологический синтез биоразрушаемых полимеров и область их применения.....	24
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	29
2.1. Техническая характеристика Биомедицинского центра.....	29
2.2. План отбора проб для микробиологического мониторинга	30
2.3. Мониторинг микрофлоры воздуха.....	31
2.4. Санитарно – бактериологический мониторинг поверхностей стен и технологического оборудования.....	33
2.5. Контроль жизнеспособности и чистоты биомассы клеток <i>Cupriavidus eutrophus</i> в процессе хранения	34
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
3.1. Микробиологический мониторинг чистых помещений биотехнологической лаборатории.....	35

3.2. Микробиологический анализ лиофилизированной биомассы бактерий <i>Cupriavidus eutrophus</i>	35
3.3. Влияние дезинфицирующих средств на обсемененность воздушной среды и поверхностей в помещениях.....	35
3.5. Оценка эффективности седиментационного метод апо сравнению с аспирационным методом	35
3.6. Рекомендации для микробиологического мониторинга производства Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов.....	35
ВЫВОДЫ.....	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	37
ПРИЛОЖЕНИЕ А	46

ВВЕДЕНИЕ

Базовые принципы *обеспечения качества и контроля качества* связаны между собой и имеют важное значение в организации биотехнологического производства. Для того, чтобы выпустить качественную продукцию, следует предпринимать все обязательные меры согласно требованиям производства. При этом необходимо проводить регулярный контроль качества, который заключается в отборе проб, оценке и анализе показателей и оформлении требуемой документации [10].

Базовые требования биотехнологического и, в частности, микробиологического производства включают в себя обязательное условие – *предотвращение перекрестного загрязнения*. Штаммы-продуценты, используемые при ферментации, могут быть контаминированы другими микроорганизмами, частицами пыли из воздуха и с поверхностей оборудования, а процесс ферментации может нарушаться под воздействием дезинфектантов или посторонних веществ. В том случае, если при культивировании разных штаммов-продуцентов используют одну и ту же ферментационную линию, для предотвращения контаминации каждой последующей культуры предыдущей необходимо проводить эффективную очистку оборудования [10].

Чистота производственных помещений является необходимым условием, обеспечивающим реализацию высококачественной продукции, соответствующей критериям надежности и безопасности. Исходя из этого принципа, обеспечение чистоты и ее контроль являются базовой основой качественного биотехнологического производства [31, 43, 45]. Основным инструментом обеспечения стандарта качества является внедрение правил GMP при получении не только фармацевтической, но и другой биотехнологической продукции. Актуальность этого вопроса становится наиболее очевидной в условиях конкуренции с зарубежными производителями. Важность развития «чистых технологий» в России будет

способствовать созданию биотехнологических производств, соответствующих требованиям международных и российских стандартов качества [44].

Целью данной работы было проведение микробиологического мониторинга биотехнологического процесса на примере технологии получения микробного полимера – поли(3-гидроксibuтирата) (П(ЗГБ)), реализуемой в Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ (далее – Лаборатории).

Для достижения поставленной цели, были определены следующие задачи:

1. Проведение микробиологического мониторинга и оценка степени микробной контаминации помещений Лаборатории – воздушной среды, поверхностей стен, технологического оборудования.

2. Оценка влияния озонирования и обработки дезинфектантами на обсемененность воздушной среды и поверхностей оборудования Лаборатории

3. Проведение анализа жизнеспособности и чистоты биомассы бактериальной культуры штамма-продуцента *Cupriavidus eutrophus* на разных сроках хранения.

4. Влияние длительного хранения на содержание П(ЗГБ) в биомассе бактериальной культуры *Cupriavidus eutrophus*.

5. Разработка рекомендаций для проведения микробиологического мониторинга биотехнологического производства.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Мониторинг качества биотехнологических производств

Многие современные технологии получения целевых продуктов для фармакологии, биомедицины, пищевой промышленности, сельского хозяйства и т.д. основаны на биотехнологических процессах и культивировании микроорганизмов. Новейшие биотехнологические методы связаны с использованием генно-инженерных технологий и изменением генотипа микроорганизмов для получения высокоэффективных полезных штаммов. Благодаря этому увеличивается разнообразие биотехнологической продукции [51].

В XXI веке биотехнология помогает в решении таких задач, как охрана здоровья, обеспечение человека продуктами питания и охрана окружающей среды. В связи с этим, важным вопросом в экономике развитых государств становится достижение превосходства в развитии биотехнологии, обязательным условием которого является повышение качества биотехнологических процессов и контроль над биотехнологическими, физико-химическими и микробиологическими процессами [1, 51].

К биотехнологическим производствам и технологии, используемой для получения целевых продуктов, предъявляются различные требования, в том числе к уровню соблюдения асептики в процессе культивирования штамма-продуцента, а также выделения и очистки целевого продукта. От назначения получаемых конечных продуктов зависят выдвигаемые требования. Создание и реализация биотехнологического производства требует решения ряда технологических задач, среди которых существенное место занимают вопросы микробиологической чистоты [52].

Одной из важнейших проблем любого биотехнологического производства является 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 [47].

Зачастую персонал является источником заражения продукта посторонней микрофлорой в процессе его производства [74]. На руках можно обнаружить разных представителей резидентной и транзитной микрофлоры кожных покровов, в том числе следующие виды: *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* и др. [26, 9]. В связи с этим необходимо контролировать гигиену сотрудников организации, для чего проводят взятие смывов с поверхности рук и анализ микробного обсеменения [24]. Защитная одежда персонала служит барьером от загрязнений, выделяемых человеком, и является важным атрибутом, который препятствует контаминации продукта и всего технологического процесса [69]. В большинстве случаев, одежда должна полностью закрывать части тела, материал одежды должен эффективно задерживать загрязнения и частицы, выделяемые персоналом, а также должен быть устойчивым к износу [13].

В основе большинства биотехнологических производств лежит использование микробиологических процессов. Производственные помещения зачастую не являются стерильными, следовательно, в таких условиях возникает высокая вероятность контаминации готовой продукции [24]. Уровень микробного загрязнения воздуха зависит от санитарно-гигиенического состояния самого помещения, количества людей и их активности, а также наличия системы вентиляции и очистки воздуха [80]. Микроорганизмы, обитающие в воздушной среде, могут инфицировать культуру штамма-продуцента в процессе ферментации, вплоть до ее полного вытеснения, или модифицировать конечный продукт биосинтеза, изменяя его физико-химические свойства и нарушая механизмы действия [30]. Следовательно, чистота помещений обеспечивает производство

высококачественного продукта [10], таким образом, следует своевременно проводить оценку качества воздушной среды для снижения риска контаминации [55]. Мониторинг воздушной среды закрытых помещений проводится в соответствии с установленной программой [82], которая включает в себя предварительно определенные места пробоотбора, необходимый объем воздуха для каждой пробы, количество проб, интервал времени между отборами проб, а также приемлемые границы предельно допустимых значений. Приборы, используемые для мониторинга, должны быть исправны [15].

Контроль микрофлоры воздушной сферы помещений, используемых для биотехнологических процессов, обычно проводится один раз в месяц и обуславливается назначением контролируемого помещения, его расположением в технологическом процессе и его ролью в качестве возможного источника контаминации [49]. Периодичность контроля концентрации микробных частиц в воздухе зависит от типа процесса, используемого продуцента, назначения конечного продукта и может быть увеличена в том случае, если программой контрольных мероприятий предусмотрен частый мониторинг по концентрации аэрозольных частиц [83]. Если содержание микрофлоры превышает предельно допустимые концентрации, то воздух помещения необходимо фильтровать или обеззараживать для снижения уровня его обсемененности [57]. Существуют и другие факторы контаминации, оказывающие влияние на производство целевого продукта: аэрозольные частицы и химические вещества [10].

В помещениях классов чистоты А и В производится стерильная продукция. Нестерильные продукты производятся в помещениях классов чистоты С и D. В данных помещениях предусматривается нормирование содержания жизнеспособных микроорганизмов в воздухе. Содержание механических частиц не учитывается [12].

Еще одним важным требованием обеспечения производственной безопасности является предотвращение перекрестного загрязнения. Для

этого биотехнологическое производство оборудуют системой шлюзов, устройствами, обеспечивающими вентиляцию воздуха, а также проводят уборку помещений с деконтаминирующими средствами [3].

Оборудование для производства целевого продукта является критическим элементом и определяет качество выпускаемой продукции. Проверка чистоты оборудования проводится в несколько этапов [10]:

- очистка оборудования;
- отбор проб;
- передача проб в отдел контроля качества (химическую и микробиологическую лаборатории);
- заполнение протокола валидации;
- анализирование полученных результатов и сравнение их с критериями приемлемости;
- составление отчета о валидации.

Пробы отбираются после окончания очистки и сушки технологического оборудования. Оборудование должно быть проверено на отсутствие остатков продукта, вспомогательных веществ, моющих средств перед проведением процесса валидации очистки оборудования [42].

Согласно требованиям GMP, следует вести протоколирование, документацию всех производственных процессов на предприятиях микробиологических производств для получения надлежащей готовой продукции [12, 16, 34].

Для обеспечения биобезопасности биотехнологических производств необходимо организовать производство с соблюдением правил асептики, которые направлены на [14]:

- исключение проникновения контаминантов в производственный процесс;
- исключение проникновения ферментируемого биообъекта с воздушными потоками в окружающую атмосферу.

Специализированное оборудование и технологии обеспечивают асептические условия производства. Проникание в ферментер посторонней микрофлоры может привести к получению некачественного продукта [14].

Благодаря стерилизации воздуха, питательной среды и оборудования, герметичности приборов, устройств для отбора и контроля проб, обеспечением стерильных условий в течение всего процесса ферментации предотвращается проникновение посторонней микрофлоры в технологический процесс [14].

Таким образом, для нормального протекания технологического процесса биотехнологического производства и получения качественного целевого продукта, следует своевременно проводить мониторинг санитарно-гигиенического состояния производства, который включает в себя контроль чистоты технологического оборудования, гигиену персонала и анализ чистоты воздушной среды [24].

1.2. Требования к чистым помещениям

Чистые помещения представляют собой зоны, в которых проводится обязательный контроль уровня загрязнений для предотвращения контаминации в процессе производства целевого продукта. Уровень загрязнений не должен превышать предельно допустимые концентрации. Чистые помещения проектируются таким образом, чтобы они были пригодны 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 [78].

В чистых помещениях необходимо создавать избыточное давление для предотвращения перемещения микроорганизмов с потоком воздуха от одной комнаты к другой [76]. Поэтому для поддержания необходимого уровня микробной загрязненности воздуха чистых помещений важную роль играют

конструкции системы вентиляции, отопления и кондиционирования воздуха. Данные системы направлены на поддержание необходимой температуры и влажности, избыточного давления и воздухообмена в помещениях, что важно для поддержания асептических условий [85]. Важным условием исправного функционирования чистых помещений является проведение анализа чистоты помещений в соответствии с разработанным планом [62].

К строительству чистых производственных помещений предъявляются специальные требования. Используемые материалы не должны изменять свои свойства и состав при дезинфекции. Поверхности помещений должны быть гладкими, прочными, поддаваться легкой мойке (запрещается применять пористые материалы), стены, потолок и полы – не должны иметь стыков [62].

Для анализа санитарно-гигиенического состояния чистых помещений в них определяют общее микробное число, наличие санитарно-показательных микробов (стафилококков, α - и β -гемолитических стрептококков, грамотрицательных условно-патогенных бактерий). На микробиологических предприятиях проводят исследование на наличие микроорганизмов-продуцентов (*Candida* – на гидролизно-дрожжевых заводах; *Aspergillus* и споровые бактерии – на ферментных заводах; *Bacillus thuringiensis* и сальмонеллы – при производстве бактериальных средств защиты растений и борьбы с грызунами) [29, 32].

Обнаружение патогенных или условно-патогенных микробов из воздушной сферы проводят на специальных дифференциально-диагностических средах [29]: среда Эндо (для выделения *Escherichia coli*), кровяной агар (для выделения патогенных бактерий), хромогенный колиформный агар (для обнаружения колиформных бактерий) [48], агар Сабуро (для дрожжевых и плесневых грибов).

Чистые помещения не должны содержать споры дрожжевых и плесневых грибов. При повышенной влажности в помещениях обнаруживаются споры плесневых грибов. При вдыхании спор грибы р.

Aspergillus вызывают аспергиллезы, р. *Penicillium* – пенициллезы, р. *Mucor* – зигомикозы. Это вредно для людей со сниженным иммунным статусом [33].

Нормативы бактериальной обсемененности и содержания санитарно-показательных микробов в воздушной сфере закрытых помещений мало разработаны [29]. Некоторые санитарно-бактериологические нормы, рекомендуемые при анализировании воздушной среды таких помещений, приведены в таблицах 1, 2, 3, 4, 5.

Таблица 1 – Допустимые значения микробной обсемененности воздуха чистых помещений в зависимости от их функционального назначения и класса чистоты [48]

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, 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	

В зависимости от микробного загрязнения воздуха проводится классификация чистых помещений и чистых зон. Подтверждение класса чистоты необходимо четко отделять от мониторинга производственной среды при проведении процесса. Максимально разрешенная концентрация аэрозолей для каждого класса отображена в таблице 3 [38, 40].

Таблица 2 – Уровень микогенной контаминации воздуха различных помещений [68]

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

Для производства стерильных лекарственных средств выделяют четыре класса чистоты помещений. Класс А – локальные зоны для операций с высокой степенью риска, например, наполнение сосудов в асептических условиях. Класс В образует окружающую среду (фон) для зоны класса А. Классы С и D используются для выполнения менее критических операций[38, 40].

Таблица 3– Классификация чистых помещений и чистых зон[38, 40]

Зона	Максимально допустимое число частиц в 1 м ³ 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

Некоторые документы дают разные классификации классов чистоты помещений. Для целей классификации в зонах класса А минимальный объем отбираемой пробы воздуха должен быть не менее 1 м³ для каждой точки отбора проб. Класс А соответствует классу ИСО 4.8 по показателю предельно допустимого количества частиц в воздухе размером 5,0 мкм. Класс В (в оснащённом состоянии) по количеству аэрозолей соответствует

классу ИСО 5 по количеству частиц обоих указанных размеров. Класс С (в оснащённом и эксплуатируемом состояниях) 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 [38].

Таблица 4 – Классы чистоты по взвешенным в воздухе частицам для чистых помещений и чистых зон [11]

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 [38, 40, 59]

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:
 (a) Приведены средние значения
 (b) Отдельные пластины для седиментации могут экспонироваться менее 4 часов.

В связи с этим, чистые помещения должны быть спроектированы и построены таким образом, чтобы максимально снизить возможность возникновения контаминации на всем протяжении производственного процесса, что может гарантировать выпуск готового продукта высокого качества и надежности [62].

1.3. Методы очистки и дезинфекции воздушной среды, поверхностей стен и технологического оборудования на производстве

В чистых помещениях необходимо следить за уровнем загрязнения воздушной сферы [20]. Без чистоты на производстве невозможно создать качественный продукт [25].

В закрытых помещениях существуют различные методы дезинфекции, направленные на снижение микробной обсемененности воздуха закрытых помещений [56, 67]. Базовыми методами дезинфекции воздушной сферы и поверхностей являются: механический, физический и химический [56].

Крупные зоны с большим количеством поверхностей и оборудования дезинфицируют аэрозольным химическим методом. Суть аэрозольного метода дезинфекции заключается в насыщении воздуха герметично закрытого помещения частицами аэрозоля-дезинфектанта [56]. Взвешенные частицы аэрозоля вступают в контакт с воздушной средой и всеми поверхностями в помещении, дезинфицируя их. Площадь поверхности, покрываемая при распылении 1 грамма аэрозоля с дисперсностью 10 мкм, составляет 6000 см², а при дисперсности в 1 мкм – 60000 см² [73]. В обеззараживании технологических поверхностей используют жидкие дезинфицирующие препараты (сулема, карболовая кислота, диоксид хлора, формалин, каустическая сода, аламинол, пероксид водорода и др.) [14]. Диоксид хлора способен нарушать клеточный метаболизм микроорганизмов, путем взаимодействия с аминокислотами и РНК в клетке [56]. Он является в

10 раз более эффективным дезинфектантом, чем хлор и хлорсодержащие дезинфектанты [27]. К основным методам дезинфекции относятся обмывание, орошение, протирание смоченной ветошью и т. д. [14].

Не менее эффективным способом является ультрафиолетовое бактерицидное излучение, которое эффективно снижает концентрацию микробов в воздушной сфере и на поверхностях оборудования, доступных для ультрафиолетового облучения [21, 50].

С учетом длины волны УФ-спектр можно поделить на части. Часть спектра в диапазоне от 240 до 320 нм (длина волны близка к пикам поглощения ДНК и белков) используется в качестве бактерицидного средства для ликвидации находящихся в воздухе патогенных микробов. Также необходимо уделять внимание потоку излучения, плотность которого связана с количеством излучения на определенной длине волны, которое достигает поверхности патогенов. Доза УФ-излучения, необходимого для эффективной борьбы с микроорганизмами воздушной сферы определяется сочетанием длины волны УФ-излучения, потока излучения и времени воздействия [71].

Процедура УФ дезинфекции является физическим, безреагентным методом, который не имеет явных недостатков физических способов дезинфекции: ограниченность остаточного содержания реагентов, невозможности непрерывного использования реагентов для обработки помещений, объектов в присутствии людей. Также данный способ дает возможность уничтожать вирусы, дрожжевые и плесневые грибки. При использовании УФ метода отсутствует передозировка и не возникает отрицательный эффект [53].

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 [53].

Бактерицидные облучатели для обеззараживания воздуха делятся на три группы: открытые (настенные, напольные и потолочные), закрытые и

комбинированные. В открытых облучателях УФ поток от лампы и отражателя охватывает широкую зону в пространстве, вплоть до телесного угла. Открытые комбинированные облучатели имеют поворотный экран (отражатель), который направляет поток излучения в нужную зону пространства. В данном случае дезинфекция проводится прямым и отраженным УФ излучением. Бактерицидные облучатели открытого типа можно использовать исключительно в отсутствии людей [53].

В рециркуляторах (закрытых облучателях) бактерицидный поток от лампы распространяется в ограниченной области и не выходит извне. Дезинфекция воздушной сферы производится в процессе его прохождения через рециркулятор. Назначение рециркуляторов – дезинфекция воздушной сферы производственных помещений, больниц, помещений общественного питания, торговли и других мест, где необходимо поддерживать чистоту воздуха [53].

Другим способом очищения воздуха от микробного загрязнения является использование озона. Микробная инаktivация путем озонирования – это сложный процесс. Озон имеет исключительную способность атаковать различные компоненты клеточных мембран, клеточных стенок, цитоплазмы и оболочек эндоспор [79]. Согласно литературным данным, озон обладает высокой окислительной активностью, именно это является следствием его бактерицидного действия: дополнительный атом кислорода при взаимодействии с клетками микроорганизмов разрушает их путем окисления [72].

Имеются данные, что тщательная уборка и обеззараживание поверхностей в помещениях являются необходимыми элементами программы по поддержанию заданного уровня чистоты помещений [60]. Массовое применение нашли традиционные методы ручной уборки с применением хлорсодержащих дезинфектантов. Хлор, проникая в клеточную мембрану бактерий, взаимодействует с белками, окисляет их, что приводит к гибели клетки. Преимуществом хлорсодержащих дезинфицирующих средств

являются низкая стоимость, удобство применения (хлорная кислота легко растворяется в воде) и высокий бактерицидный эффект, вследствие этого данные средства активно используются в медицинской и микробиологической промышленности. Несмотря на преимущества, данное средство все же имеет и ряд недостатков: после растворения в воде дезинфектант становится нестабильным, а также под влиянием света, температуры или влаги может произойти потеря активного компонента. В последующих исследованиях было обнаружено наличие остаточного содержания дезинфектантов на основе хлора на поверхностях, что приводит к сильному раздражению слизистых оболочек носа и горла людей. Помимо этого, применение хлорсодержащих дезинфектантов наносит серьезный ущерб окружающей среде [65].

На сегодняшний день, согласно литературным данным, традиционные методы ручной очистки и дезинфекции являются слабо эффективными и часто неоптимальными, особенно для больших по площади помещений [60, 66].

Таким образом, для получения требуемой результативности в дезинфекции поверхностей и воздушной сферы традиционные методы очистки необходимо совмещать с новейшими методами с применением новых современных дезинфектантов с доказанной эффективностью [60].

1.4. Методы анализа микрофлоры воздуха

Воздух закрытых помещений сильно отличается от атмосферного воздуха по количественному и качественному составу микроорганизмов. Концентрация бактерий в помещениях выше концентрации бактерий в атмосферном воздухе, в том числе и патогенными видами, попадающими в воздух от больных людей [37].

Оценка воздушной среды производственных помещений может осуществляться по количеству общей микробной обсемененности. Вместе с

этим важно учитывать, что общее число микроорганизмов в конкретном объеме воздуха имеет значение как относительный показатель чистоты воздуха [15]. Для исследования микрофлоры закрытых помещений используют различные методы [37].

Традиционным методом анализа микрофлоры воздуха является седиментационный метод (метод Коха), в основе которого лежит оседание микробов под действием силы тяжести на поверхность питательной среды открытой чашки Петри [37]. Чашки Петри с застывшей питательной средой оставляют открытыми на разных высотах на конкретно заданное время (10-30 мин), далее термостатируют и определяют видовую принадлежность. Затем определяют общее микробное число (ОМЧ). При выявлении воздушной среды на содержание бактерий используют мясопептонный агар (МПА), а при выявлении грибов – агар Сабуро [9, 28, 41]. Недостатком данного метода является низкая точность, так как не все микробные частицы оседают на поверхность питательной среды [36].

При использовании фильтрационных методов через жидкость продувается воздух, используется прибор Дьяконова. Указанные методы базированы на удержании бактерий в жидкости, которая далее может быть использована для посева на различные питательные среды [37].

Прибор Речменского используется в методах, базированных на осаждении микробных аэрозолей паром или распыленной жидкостью [37].

Имеются методы, базированные на использовании специальных устройств, действие которых основано на принципе ударно-пробивного действия воздушной струи. Например, прибора Кротова. В основе метода лежит прохождение струи воздуха через узкую клиновидную щель и ее ударение с большой скоростью о влажную поверхность питательной среды. В результате удара находящиеся в воздухе аэрозоли, в том числе пылевые частицы, содержащие бактерии, и капли, прибиваются к поверхности питательных сред. Производительность такого прибора составляет 20-40 л/мин. Подобные методы наиболее надежны и точны [37].

Для контроля чистоты помещений необходимо проводить анализ общей обсемененности воздушной среды. Анализ чистоты воздуха проводится методами, представленными выше. Однако рекомендованные к применению методы не дают представления о полной картине циркулирующих в помещениях микроорганизмов [2].

1.5. Санитарно-бактериологическое исследование поверхностей технологического оборудования

Для анализа чистоты исследуемого объекта и микробиологического мониторинга эффективности обработки различных поверхностей проводится изучение микробной обсемененности [37]. Как правило, определяют ОМЧ (обычно с пересчетом на 1 см² исследуемой поверхности); наличие колиформных бактерий, стафилококков и других микроорганизмов [37].

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

Смывы производят с помощью стерильных увлажненных тампонов или салфеток. Стерильные ватные тампоны на стеклянных или металлических палочках, закрепленные в пробирки с ватными пробками, заготавливают заранее в лаборатории. Далее 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 [4].

Смывы с поверхностей стен и оборудования берут с площади 100 см². Для ограничения поверхности используется шаблон (трафарет из проволоки или металлической пластинки), стерилизуемый перед каждым новым смывом путем обжига в пламени спиртовки. Смыв с поверхности берется методом

протираания увлажненным тампоном во взаимно перекрещивающихся направлениях [4].

В эксплуатируемом состоянии помещения имеются рекомендуемые значения при микробиологическом контроле чистых зон методом смывов с поверхностей. В критической зоне количество жизнеспособных колоний не должно превышать 2 КОЕ/см², а в некритической зоне допустимое количество жизнеспособных колоний не должно превышать 5 КОЕ/см² [20].

Наиболее быстрым и современным методом мониторинга чистоты поверхностей является определение АТФ (аденозинтрифосфат), который является основным источником энергии для живых клеток, в исследуемых образцах помощью люминометра, который отображает результат в Относительных световых единицах (RLU). Значения RLU отображаются вследствие люминесценции, возникающей при взаимодействии люциферин/люциферазы с АТФ. Значения RLU служат для определения общей качественной оценки.

С помощью теста «MicroSnapTotal» с 7-часовой инкубацией взятого образца (термостатирование при 30°C) определяется содержание КОЕ, и АТФ-теста «UltraSnap» без периода инкубации, результат получают в Относительных световых единицах (RLU), значения которых служат для определения общей качественной оценки: чисто, недостаточно чисто или грязно [23].

Интерпретируют полученные результаты АТФ-теста «UltraSnap» согласно Таблице 6. Результат теста «MicroSnapTotal» отображается на дисплее в Относительных световых единицах. Для интерпретации полученных результатов используют Таблицу 7.

Минусом данного метода является то, что люминометр фиксирует весь АТФ. Известно, что АТФ образуется не только микробными частицами, но и любой другой органикой. Следовательно, использование данного метода не может заменить тест на микробиологическую чистоту. Однако применение специальных тест-систем с термостатированием взятого образца позволяет

установить содержание КОЕ. В данном методе возможно применение прибора «hygieneEnSURE» [23].

Таблица 6 – Соответствие значения RLU степени чистоты поверхности [23]

RLU	Поверхность
≤ 10	Чистая
11 - 29	Недостаточно чистая
≥ 30	Грязная

Таблица 7 – Соответствие значения RLU наличия/отсутствия бактерий в КОЕ/г после 7-часового культивирования при температуре 30°C [22]

КОЕ/г	RLU
≤ 10	≤ 10
≤ 20	≤ 20
≤ 30	≤ 30
≤ 50	≤ 50
≤ 100	≤ 100
≤ 1000	≤ 1000
Сплошной рост	≥ 5000

1.6. Микробиологический синтез биоразрушаемых полимеров и область их применения

В современном мире невозможно обойтись без полимерных материалов. На данный момент активно применяются синтетические материалы и полимеры биологического происхождения [6].

Использование синтетических полимеров, таких как полиэтилен, нейлон, полиуретан, имеет много недостатков. В частности, их получают из

невозобновляемых ресурсов, а также они длительно не деградируют в природной среде, следовательно, их накопление приводит к загрязнению окружающей среды и влечет за собой глобальную экологическую проблему. В связи с этим, сейчас ведутся активные разработки новых экологически чистых полимерных материалов [19].

Биополимеры подразделяются на две категории: полимеры, синтезируемые химическим путем, но на основе сырья биологического происхождения (аминокислот, жиров, углеводов) и полимеры, полученные путем микробного биотехнологического синтеза [6].

К химически синтезированным полимерам относятся полилактид, поли(ϵ -капролактон), полигликолевая кислота, поливинил алкоголь и др. Данные химические вещества подвергается ферментной атаке [8].

К биополимерам относятся полигидроксиалканоаты (ПГА), которые, как и другие биополимеры, являются запасными макромолекулами клетки и синтезируются микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста, когда биосинтез белка и нуклеиновых кислот ограничен [58, 77]. Специфические условия для биосинтеза ПГА можно создать путем лимитирования питательных веществ в культуральной среде, например, азота или кислорода. При таких условиях происходит активизация ферментов цикла биосинтеза поли-3-гидроксибутирата [63]. Многие микробные биополимеры служат запасными веществами, следовательно, обеспечивают выживаемость микроорганизмов в неблагоприятных условиях среды [11].

Особое внимание среди огромного разнообразия веществ, получаемых в биотехнологической промышленности, заслуживают микробные термопластичные поли(3-оксиалканоаты) – полимеры 3-оксинасыщенных жирных кислот. Исходя из литературных данных, наиболее изученным считается полигидроксибутират (ПГБ) – гомополимер D-(3)-оксимасляной кислоты. Данные биополимеры обладают механическими и физическими свойствами, близкими к полиэтилену и полипропилену, однако они имеют

свои уникальные особенности, такие как биodeградируемость, биосовместимость и другие полезные свойства [7]. Не так давно учеными были обнаружены новые биополимеры – гетерополимеры, включающие мономеры 3-оксинасыщенных жирных кислот (оксималяной, оксивалериановой, и др.) в различных соотношениях и вариантах. Данные полимеры обладают биodeградируемостью, а также они достаточно термопластичны. На данный момент важной задачей исследователей является обнаружить новых продуцентов биополимеров данного типа, проводятся опыты по оптимизации условий их культивирования, а также изучаются свойства материалов, полученных на их основе [17].

Продуцентов ПГБ обнаружено достаточно много. Существуют природные и генетически модифицированные штаммы продуценты. К природным штаммам относятся представители родов *Cupriavidus* (ранее – *Alcaligenes*, *Ralstonia*), *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Methylotrophus*, *Methylobacterium*, а также рекомбинантные штаммы бактерий *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas oleovorans* и др. [8]. Биосинтез ПГБ и его сополимеров возможно осуществить 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. [8]. Наибольшей вероятностью контаминации при ферментации является культивирование на углеводных субстратах – глюкозе и фруктозе, поэтому в условиях гетеротрофного роста необходим тщательный контроль на всех стадиях производства.

ПГБ при накоплении может составлять до 90 % от сухого веса бактериальных клеток. Во внутренней части клеток ПГБ накапливается в цитоплазме в виде гранул и находится в аморфном подвижном состоянии [81]. Мицеллообразные кристаллы полимера образованы фибриллами, что в свою очередь формирует гранулы. Гидрофобность и плотность биополимеров обеспечивают фосфолипидные оболочки полимерных цепей в

гранулах, которые укреплены белковыми структурами и расположены монолинейно. ПГБ имеет необходимые температурные характеристики и способность формироваться в нативном состоянии, что определяет термомеханические свойства ПГБ и возможность создавать их полимера специальные изделия [64,70].

Полигидроксиалканоаты, помимо термопластичности, обладают еще и антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и, что наиболее важно, они биосовместимы и биоразрушаемы. На основе ПГА можно получать различные комбинации и композиты с синтетическими и природными материалами, что позволяет целенаправленно изменять их состав, структуру, тем самым изменяя основные свойства материала: механическую прочность, пластичность, температурные и другие характеристики, что расширяет возможные сферы применения ПГА [70].

В связи с тем, что полимеры биологического происхождения достаточно разнообразны, их свойства уникальны, а также благодаря биотехнологическим методам, есть возможность получать экологически чистые материалы, не нанося урон окружающей среде [24].

Полигидроксиалканоаты успешно используются в медицине, например, в хирургии в качестве прочного хирургического материала, способного к саморазрушению (биодеградация), как элементы для остеосинтеза и сосудистой пластики, в роли пленочных покрытий ран и ожоговых поверхностей; в фармакологии появилась возможность создавать лекарственные средства с пролонгированным действием [8].

Применение ПГА в медицине является многообещающим. Например, ПГА используют 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 [5, 61,84].

Особенно актуальной проблемой современной медицины является проблема восстановления дефектов костной ткани. В последнее время все

активнее ведутся разработки для решения данной проблемы. Ученые стремятся разработать и внедрить новые методики реконструктивных операций с использованием материалов, которые способны восполнить утраченный объем кости. Высокоперспективным материалом для достижения поставленных целей выступают ПГА. Данные полимеры обладают целым рядом свойств: биосовместимость, высокая прочность и медленная биодеградация, которые позволяют им занять первое место по значимости для применения в биомедицинских целях. Следовательно, необходимо проводить тщательный контроль биосинтеза ПГА и получения готового продукта на всех стадиях технологического процесса [57].

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Техническая характеристика Биомедицинского центра

На территории Сибирского федерального университета расположен Биомедицинский центр, в котором ведется производство биоразрушаемых полимерных материалов микробного происхождения. На первом этаже лаборатории организовано опытное биотехнологическое производство по получению полимерных изделий медицинского назначения (Рис. 1).



Рисунок 1–Биомедицинский центр СФУ и ферментационная линия

Чистота помещений лаборатории обеспечивается защитными конструкциями с системой шлюзов для материалов и персонала, в помещения лаборатории подается очищенный воздух класса чистоты В по ГОСТ Р 52249-2009.

Воздух, который подается в помещения лаборатории, проходит трехступенчатое очищение в соответствии с ГОСТ Р 51251-99:

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

Критические операции выполняются в зонах класса чистоты В, которые оборудованы ламинарными боксами, обеспечивающими зоны чистоты класса А.

Поверхности стен и потолка гладкие, непроницаемые, легко подвергаются очистке и обработке дезинфектантами. Полы покрыты полимерным материалом. Двери имеют двухстворчатую конструкцию. В основе дверного полотна и дверной коробки лежит алюминиевый профиль высокого качества. Дверные конструкции покрыты специальной порошковой краской, которая остается стабильной под воздействием дезинфектантов и ультрафиолетового облучения.

2.2. План отбора проб для микробиологического мониторинга

Отбор проб ведется в помещениях первого этажа Биомедицинского центра: ферментационная зона, зона средоподготовки, зона музейной культуры, зона аппаратчиков согласно Рис. 2.

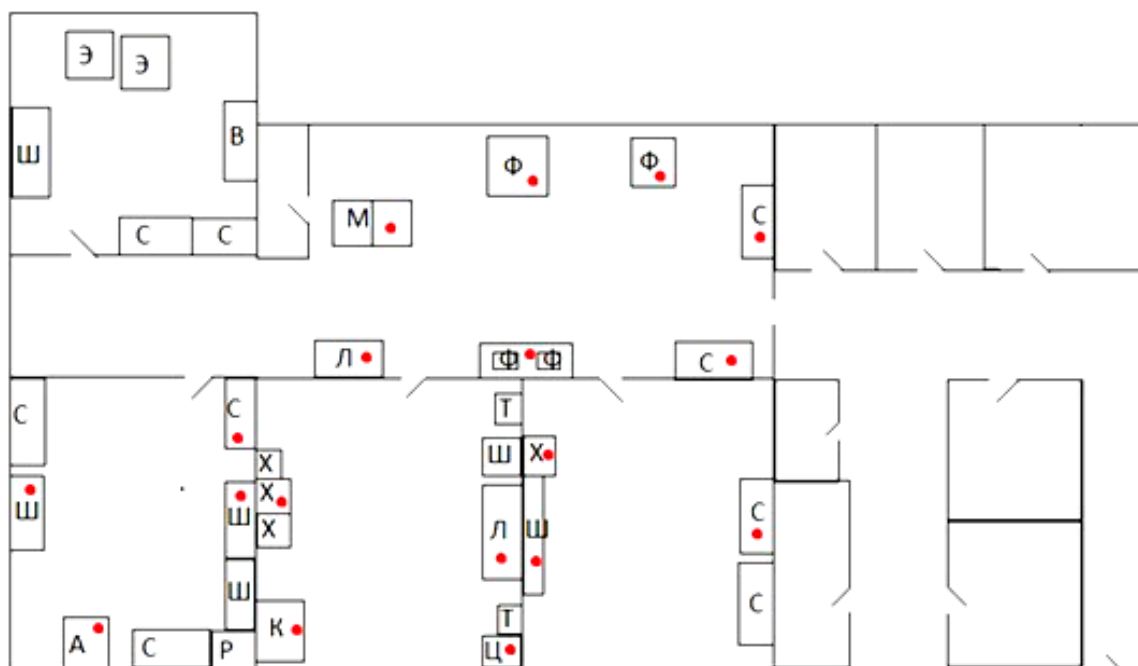


Рисунок 2 – Схема первого этажа лаборатории опытного производства
Сокращенные обозначения: Ш – шкаф; С – стол; Х – холодильное оборудование; Ф – ферментер; М – моечная машина; Л – ламинарный шкаф; Т – тумба; Ц – центрифужная машина; К – качалка (шейкер); Р – раковина; А – автоклав; Э – экстракционное оборудование; В – вытяжной шкаф. Места отбора проб обозначены красными точками.

Контроль чистоты бактериальной культуры *Cupriavidus eutrophus* проводили согласно разработанной схеме (Рис. 3). На каждой стадии высевали бактериальную культуру (содержимое колб или ферментеров) из разведений 10^{-10} – 10^{-13} на мясопептонный агар (МПА) (Nutrient Agar, HiMedia). Чашки с посевами инкубировали при температуре 30°C в течение 3-х суток анализирували выросшие колонии, микроскопируя прижизненные препараты. Грам принадлежность определяли экспресс-методом Грезерсона.



Рисунок 3– Схема проведения микробиологического анализа чистоты бактериальной культуры

2.3. Мониторинг микрофлоры воздуха

Мониторинг микрофлоры воздуха проводили седиментационным и аспирационным методами на агаризованных питательных средах: для выделения бактерий применяли мясопептонный агар (МПА) (Nutrient Agar, HiMedia) и для выделения дрожжевых и плесневых грибов – агар Чапека (Czapek Dox Agar, HiMedia). Для анализа микрофлоры воздуха седиментационным методом чашки Петри с застывшим МПА или средой Чапека размещали на разной высоте в открытом состоянии, по истечении 30 минут чашки закрывали и помещали в термостат. Чашки с МПА инкубировали трое суток при температуре 30°C. Чашки с агаром Чапека термостатировали при 25 °С в течение семи суток. После инкубирования

проводили подсчет выросших колоний. Далее пересчитывали количество выросших колоний на 1 м³ по формуле:

$$Z = \frac{(L \times 100)}{63,6} \times 100,$$

где Z – содержание бактерий или спор грибов в 1 м³, КОЕ/м³

L – сумма выросших колоний на чашке [59].

Далее описывали колонии по внешним признакам и проводили микроскопирование отдельных колоний.

Для анализа микрофлоры воздуха аспирационным методом чашки Петри с застывшим МПА или агаром Чапека помещали в аспиратор ПУ-1Б, предварительно увлажнив многосопловую решетку пробоотборника 70%-этиловым спиртом и профломбировав ее в пламени спиртовки. Объем отбираемой пробы воздуха составлял 100 л. После чего чашки Петри термостатировали. Чашки с МПА инкубировали при температуре 30°С в течение трех суток. Чашки с агаром Чапека инкубировали при 25°С в течение семи суток. После инкубирования проводили подсчет выросших колоний.

Концентрацию микроорганизмов в исследуемом воздухе определяли по формуле [46]:

$$Z=1000*M/V$$

Z - содержание частиц в воздухе, (КОЕ/м³)

M - количество частиц в отобранной пробе

V - объем отобранной пробы, (литр).

При числе колоний, не превышающих 35, наиболее вероятное число частиц равно числу колоний. С большим количеством колоний расчеты должны производиться на основе Таблицы 8.

Таблица 8 – Соотношение наиболее вероятного числа осажденных микробов (М) к количеству колоний (N)[46].

N	M	N	M	N	M	N	M
1	1	51	55	102	119	153	198
3	3	54	58	105	123	156	203
6	6	57	62	108	128	159	208
9	9	60	65	111	132	162	213
12	12	63	69	114	136	165	219
15	15	66	73	117	141	168	224
18	18	69	76	120	145	171	230
21	21	72	80	123	153	174	235
24	24	75	84	126	154	177	241
27	27	78	88	129	159	180	247
30	30	81	91	132	163	183	253
33	33	84	95	135	168	186	259
36	38	87	99	138	173	189	265
39	41	90	103	141	178	192	271
42	45	93	107	144	182	195	278
45	48	96	111	147	187	198	284
48	51	99	115	150	193	200	291

2.4. Санитарно – бактериологический мониторинг поверхностей стен и технологического оборудования

Контроль чистоты поверхностей стен и технологического оборудования проводили с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов с площади 100 см², делая посев штрихообразными движениями на МПА для выделения бактерий и на агар Чапека для выделения дрожжевых и плесневых грибов.

Бактерии термостатировали трое суток при температуре 30°C. Грибы термостатировали семь суток при температуре 25°C. После

термостатирования подсчитывали количество выросших колоний и проводили пересчет на площадь поверхности 1 см².

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

2.5. Контроль жизнеспособности и чистоты биомассы клеток *Cupriavidus eutrophus* в процессе хранения

Для оценки влияния жизнеспособности клеток в биомассе *Cupriavidus eutrophus* разных сроков хранения на концентрацию полигидроксиалканоатов в биомассе бактерий делали посев серии разведений 10⁻³ – 10⁻⁸ в чашки Петри в количестве 0,05 мл суспензии на МПА (Nutrient Agar, HiMedia). Данный объем бактериальной суспензии распределяли продезинфицированным шпателем по поверхности питательного агара. Посев каждого разведения делали в трех повторностях. Далее чашки Петри с посевами термостатировали трое суток при температуре 30°C, после чего проводили подсчет количества микроорганизмов.

Анализ выросших колоний проводили стандартными микробиологическими методами [37, 39]. Бактериальных изолятов идентифицировали путем сравнительного анализа их морфологических, культуральных свойств. У вегетативных клеток определяли морфологию, спорообразование, подвижность. Экспресс-методом Грезерсона определяли принадлежность бактерий к группе грамположительных или грамотрицательных.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В лаборатории Биомедицинского центра разрабатывается продукция на основе биоразрушаемых полимеров, которые синтезируются штаммами хемотрофных бактерий *Cupriavidus eutrophus*.

Для получения продукта высокого качества необходимо своевременно проводить микробиологический мониторинг производства.

3.1. Микробиологический мониторинг чистых помещений биотехнологической лаборатории

3.2. Микробиологический анализ лиофилизированной биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus*

3.3. Влияние дезинфицирующих средств на обсемененность воздушной среды и поверхностей в помещениях

3.5. Оценка эффективности седиментационного метода по сравнению с аспирационным методом

3.6. Рекомендации для микробиологического мониторинга производства Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов

Изъято 15 страниц.

ВЫВОДЫ

1. Микробиологический мониторинг помещений производства биоразрушаемых полимеров показал отсутствие контаминации в процессе культивирования бактерий *Cupriavidus eutrophus* при соблюдении рекомендаций по поддержанию чистоты помещений лаборатории и соответствия помещений классу чистоты D по стандарту GMP.

2. Микробиологический контроль образцов лиофилизированной биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus* показал, что длительное хранение (от 3-х до 5,5 лет) не увеличивало уровень контаминации биомассы по сравнению с исходной. Содержание П(ЗГБ) в образцах лиофилизированной биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus* при хранении от 3 до 5,5 лет также оставалось на исходном уровне.

3. Микробная обсемененность поверхностей стен и технологического оборудования снижалась при обработке помещения с использованием аламинола в качестве дезинфицирующего средства. Концентрация микробных частиц на поверхностях оставалась в пределах нормы на протяжении 3 суток после обработки.

4. Мониторинг микрофлоры воздушной среды показал снижение концентрации микробных частиц после озонирования помещения в 1,5 раза по сравнению с результатом после обработки помещения аламинолом.

5. Разработаны рекомендации для проведения микробиологического контроля при производстве биоразрушаемых полимеров и предупредительные действия по предотвращению микробной контаминации во время ведения технологического процесса.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Антипова, Л. В. Методы исследования мяса и мясных продуктов: учеб. пособие / Л. В. Антипова, И. А. Глотова, И. А. Рогов – М.:КолосС, 2004. – 376 с.
2. Бадамшина, Г. Г. Оптимизация методов, рекомендованных для оценки состояния внутрибольничной среды / Г. Г. Бадамшина // Медицинский альманах. – 2017. – №. 4. –С. 60–62.
3. Балицкий, Ю. Контроль контаминации – технология мирового уровня [Электронный ресурс] / Ю. Балицкий, С. Н. Бабенко // Сайт надлежущей производственной практики. – Режим доступа: <http://www.gmpua.com>
4. 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.
5. Волова Т. Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов / Т. Г. Волова.– 2014.
6. Волова Т.Г. Биотехнология: Изд.2-е, перераб. / Т.Г. Волова. - Красноярск, 2002. – 267 с.
7. Волова, Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения РАН, 1999. – 252 с.
8. Волова, Т. Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т. Г. Волова, В. И. Севостьянов, Е. И. Шишацкая. – Новосибирск: Издательство СО РАН, 2003. – 330 с.
9. Волова, Т.Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севостьянов, Е.И. Шишацкая. - Новосибирск, Издательство СО РАН, 2003. – 330 с.
10. Воробьев, А. А. Медицинская и санитарная микробиология: учеб. пособие / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Щиробоков. – М.: Академия, 2009. - 464 с.

11. 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.
12. ГОСТ Р 14644-1-2002 Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. – Введ. 01.04.2004. – М.: Стандартиформ, 2004. – 20 с.
13. ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств. – Введ. 01.01.2010 – М.: Стандартиформ, 2010. – 132 с.
14. ГОСТ Р ИСО 14644-5-2005 Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 5. Эксплуатация. –М.: Стандартиформ, 2005.
15. Градова, Н. Б. Биологическая безопасность биотехнологических производств: учеб. пособие / Н. Б. Градова, Е. С. Бабусенко, В. И. Панфилов. – М.: ДеЛи принт., 2010. – 135 с.
16. Дмитриев А. Ф., Морозов В. Ю. Исследование микробной обсемененности воздуха животноводческих помещений. / А. Ф. Дмитриев, В. Ю. Морозов. Ставрополь: Издательство «АГРУС», 2005. – 28 с.
17. 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.
18. Елдышев, Ю. Н. Современная биотехнология: мифы и реальность / Ю. Н. Елдышев. – М.:Тайдекс Ко, 2004. – 196 с.
19. 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.
20. Жила Н.О. Характеристика культур *Cupriavidus eutrophus* В-10646, синтезирующей полигидроксиалканоаты при росте на сахарах и

- липидных субстратах / Н.О. Жила, Т.Г. Волова, Г.С. Калачева // Журнал Сибирского Федерального Университета, 2014. - № 2. С. 161-173.
21. Закотей, М. Технология чистых помещений в фармацевтическом производстве / М. Закотей // Фарматека. – 2001. - №5. – С. 25 – 28.
 22. 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.
 23. Инструкция по применению теста «hygienaMicroSnap Total» [Электронный ресурс]// ООО «ИнтерКлин». – Режим доступа: <https://люминометр.рф/product/1670/>
 24. Инструкция по применению теста «hygienaUltraSnap»[Электронный ресурс]// ООО «ИнтерКлин». –Режим доступа: <https://люминометр.рф/product/1654/>
 25. Иркитова, А. Н. Санитарно-гигиенический контроль при производстве сыров. / А. Н. Иркитова, Е. Ф. Отт // Сыроделие и маслоделие. – М.: АНО «Молочная промышленность», 2012. - №2. – С. 44-45.
 26. Калечиц, В.Н. Чистое помещение – чистое лекарство / В. Н. Калечиц // Технология чистоты. – 2002. – №4. – С. 11 – 14.
 27. 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>
 28. 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.
 29. Лабинская, А. С. Руководство по медицинской микробиологии: учеб. пособие / А. С. Лабинская, Е. Г. Волина – М.: БИНОМ, 2008. – 1080 с.
 30. 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.
31. Литовченко, В. Г. Аттестация чистых помещений / В. Г. Литовченко // Чистые помещения и технологические среды. – 2004. – № 3. – С.38-40.
 32. 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.
 33. МУ 44-116 Асептическое производство медицинских иммунобиологических препаратов. – Введ. 19.05.1997. –М.: Департамент госсанэпиднадзора Минздрава РФ, 1997. – 60 с.
 34. МУ 64-04-002-2002 Производство лекарственных средств. Введ 15.04.2003 – М.: ГипроНИИмедпром, 2003. – 18 с.
 35. Научный центр HIMEDIA [Электронный ресурс]: информация о готовых питательных средах. – Режим доступа:<http://www.himedialabs.ru/m1300>.
 36. Несвижская, И. И. и др. Дезинфекционные технологии для обеззараживания воздуха в лечебно-профилактических учреждениях //Український журнал екстремальної медицини імені ГО Можасва. – 2011. – №. 12, № 3. – С. 19-22.
 37. Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии: лаб. практикум / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук – М.: Академия, 2005. – 608 с.
 38. 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
 39. 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. – М.: Мир, 1997. – 422 с.
 40. Павелек, З. Курс GMP и чистые помещения [Электронный ресурс] / З. Павелек, И. Монинец // Сайт надлежащей производственной практики. –

http://www.gmpua.com/CleanRoom/Design/GMP_AND_CleanRooms.pdf

41. Поздеев, О. К. Медицинская Микробиология: учеб. пособие / О. К. Поздеев; под. ред. В. И. Покровского – М.: ГОЭТАР- Медиа, 2010. - 768 с.
42. Попов, А. Р. Дезинфекция чистых помещений // Современные требования. Чистые помещения и технологические среды.– 2003. – Т. 4. – С. 38-40.
43. Попов, А. Ю. Как наиболее эффективно соответствовать требованиям GMP? / А. Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. – 2005. – №1. – С. 9 – 10.
44. 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.
45. Попов, А. Ю. Система анализов рисков. Как соответствовать требованиям GMP / А. Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. – 2004. – №. 4. – С. 17.
46. Руководство по эксплуатации Устройство автоматического отбора проб биологических аэрозолей воздуха ПУ-1Б / ПУ-1Б исп. 1ЕВКН4. 471. 014 (-01) РЭ – 2013
47. Рымовская, М. В. Основы промышленной асептики: электронный курс лекций для студентов / М. В. Рымовская. - Минск: БГТУ, 2018. – 128 с.
48. 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.
49. Свириденко Г. М. Микробиологический контроль санитарно-гигиенического состояния производства. / Г. М. Свириденко // Переработка молока. – М.: Отраслевые ведомости. – 2010. - №8. – С. 6-8.

50. Сениор, Д. Бутилированная вода: типы, состав, нормативы: монография / под ред. Д. Сениор, Н. Дега; пер. с англ. под ред. Е. Боровиковой, Т. Зверевич. – Санкт-Петербург: Профессия, 2006 – 424 с.
51. Соловьева, А. А. Актуальные биотехнологические решения в мясной промышленности / А. А. Соловьева // Молодой ученый. – 2013. – №. 52. – С. 105-107.
52. Стасишина, Г. Н. Микробиологические исследования ферментации водородных бактерий *Alcaligenes eutrophus* Z-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.
53. Ультрафиолетовое излучение и бактерицидные облучатели для обеззараживания воздуха [Электронный ресурс]: методы обеззараживания воздуха / А. А. Семенов, Н. В. Семенова – Полтава, 2014. – Режим доступа : <http://dspace.uccu.org.ua/bitstream/123456789/2020/1/Ультрафиолетовое%20излучение%20и%20бактерицидные%20облучатели%20для%20обеззараживания%20воздуха.doc>
54. Утилизация и вторичная переработка полимерных материалов: учеб. пособие / А.С. Клинков, П.С. Беляев, М.В. Соколов. – Тамбов: ТГТУ, 2005. – 80 с.
55. 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.
56. 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 // Сервис публикации документов «DropDoc». – Режим доступа: <http://dropdoc.ru/doc/263551/e-b.-shmatkova--l.s.-fedorova--a.yu.-skopin--v.g.-akimkin> 35

57. Шумилова, А. А., Шишацкая Е. И. Материалы для восстановления костной ткани / А. А. Шумилова, Е. И. Шишацкая. – 2014.
58. Antonio, R. V. Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli* / R. V. Antonio, A. Steinbüchel, B.H.A. Rehm// FEMS Microbiol. Lett. . -2000. -p.111-117.
59. Auterhoff, G. EC Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products/ G. Auterhoff. – Aulendorf :Editio-Centor-Verl, 2002. – 300 p.
60. 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.
61. Brigham, C.J. Applications of polyhydroxyalkanoates in the medical industry / C.J. Brigham, A.J. Sinskey // Int. J. Biotechnol. Wellness Industries, 2012. – Vol. 1. – P. 53-60.
62. Burton, S. L. Comparison of cleanroom and isolator aseptic processing technology for small start-up parenteral facilities / S. L. Burton. – University of Georgia, 2016.
63. Chanprateep, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates./S Chanprateep // J. Biosci. Bioeng. - 2010.-, p. 621-632.
64. Chen, G.Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials / G.Q. Chen, Q. Wu // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26. – P. 6565-6578.
65. 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.
66. Coles, T. Sanitisation with vapour phase hydrogen peroxide—practical cycle development and future improvements / T. Coles // Clean Air and Containment Rev. – Т. 29.2017.

67. Doll, M. Environmental cleaning and disinfection of patient areas / M. Doll, M. Stevens, G. Bearman // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2018.
68. Harris, James L. Atlas of clinical fungi, CentraalbureauvoorSchimmelcultures / James L. Harris // *Mycopathologia*. – 2000. - №3. – P. 159 – 160.
69. 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.
70. Khanna, S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, K. Ashok // *Process Biochemistry*, 2004. - V. 40. - P. 607-619.
71. Krosney, M. D. Air sterilization and disinfection method / M. D. Krosney, W. E. Reisenauer. – USA. – 2016.
72. 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.
73. Lighthart, B. Atmospheric microbial aerosols: theory and applications/ B. Lighthart, A. J. Mohr – New York: Springer Science & Business Media, 2012. – 397 c.
74. 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.
75. Romano, F. Performance test of technical cleanroom clothing systems / F. Romano // *Indoor Air 2016*. – 2016. – C. 1-8.
76. Sudesh, K. Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters/ K.Sudesh, H. Abe, Y. Doi // *Progress in Polymer Science*. -2000.- p.1503-1555.
77. Tršan, M. The environmental monitoring in hospital pharmacy cleanroom and microbiota catalogue preparation / M. Tršan, K. Seme, S. Srčić// *Saudi Pharmaceutical Journal*. – 2019.

78. 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.
79. 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.
80. Volova, T.G. Microbial polyhydroxyalkanoates– plastic materials of the 21st century (biosynthesis, properties, applications) / T.G. Volova // Nova Science Pub. Inc., 2004. – P.283.
81. 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.
82. 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.
83. Zhang, X.J. Application of (R)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels / X.J. Zhang, R.C. Luo, Z. Wang et al. // Biomacromolecules. – 2009. – Vol. 10. – P. 707-711
84. Zhou, L. Studies on Comparison of Particle Concentration Models for Cleanroom / L. Zhou //Procedia Engineering. – 2017. – T. 205. – C. 3308-3315.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Алгоритм проведения микробиологического мониторинга биотехнологического производства

