

УДК 579.66

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-4-483-492>

Оригинальная статья | Original article



О.В. Гунар ,
Н.Г. Сахно ,
О.С. Тынчерова

Сравнение условий выделения микроорганизмов-контаминаントов при микробиологическом мониторинге

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Гунар Ольга Викторовна; gunar@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Программы микробиологического мониторинга состояния помещений для фармацевтического производства, включенные в нормативные документы разного уровня, различаются. В частности, это касается условий проведения эксперимента: используемых питательных сред, температуры и времени инкубации. Для унификации процедур контроля качества необходимо разработать единую стратегию обработки проб микробиологического анализа.

ЦЕЛЬ. Определение оптимальных условий инкубации посевов при микробиологическом мониторинге «чистых» помещений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Проведено сравнение условий культивирования тест-штаммов *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* ВКПМ F-62, *Aspergillus terreus* ВКПМ F-1269, *Penicillium chrysogenum* ВКПМ F-3, а также изолятов из окружающей среды *Staphylococcus epidermidis*, *Kocuria rosea*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus* spp., *Sphingomonas paucimobilis*. Питательные среды: триптиказо-соевый агар (TSA), агар Сабуро с декстрозой и хлорамфениколом (SDCA), агар Ризонера (R2A). Режимы инкубации: 2 сут при 30–35 °C, затем 3 сут при 20–25 °C; 3 сут при 20–25 °C, затем 2 сут при 30–35 °C; 48–72 ч при 30–35 °C (культтивирование аэробных бактерий); 5–7 сут при 20–25 °C (культтивирование дрожжевых и плесневых грибов).

РЕЗУЛЬТАТЫ. При культивации бактерий в средах TSA и R2A статистически значимых различий результатов, полученных при разных температурных условиях, выявлено не было. Коэффициент прорастания изолятов из окружающей среды был существенно ниже (на 19–37%) в случае их выращивания на TSA при двухтемпературной схеме инкубации (первоначальное выдерживание посевов при более низкой температуре). Выявлены группы микроорганизмов (бактерии с угнетенными физиологическими функциями и замедленным ростом, а также плесневые грибы), требующие при микробиологическом мониторинге подбора условий культивирования.

ВЫВОДЫ. Установлена необходимость стандартизации выполнения микробиологического анализа при мониторинге и его регламентация в установленном порядке в виде общей фармакопейной статьи. Показана возможность использования при микробиологическом мониторинге в качестве питательной среды как триптиказо-соевого агара, так и агара Ризонера. Применение двухтемпературной схемы инкубации с использованием одной неселективной питательной среды требует валидации в каждом конкретном случае. При культивировании тест-штаммов последовательность изменения температуры не оказывает влияния на коэффициент их прорастания, однако в случае бактерий, выделенных из окружающей среды, предпочтительным следует считать режим инкубации с более высокой температурой (30–35 °C) на начальном этапе инкубации.

Ключевые слова: микробиологический мониторинг; инкубация; двухтеппературная схема инкубации; температурный режим; чистые помещения; питательная среда; триптиказо-соевый агар; агар Ризонера; плесневые грибы

Для цитирования: Гунар О.В., Сахно Н.Г., Тынчерова О.С. Сравнение условий выделения микроорганизмов-контаминаントов при микробиологическом мониторинге. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(4):483–492. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-4-483-492>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 05600026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Olga V. Gunar ,
Nadezhda G. Sakhno ,
Olga S. Tyncherova 

Comparison of Incubation Conditions for Microbial Contaminant Isolation in Microbiological Environmental Monitoring

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

 Olga V. Gunar; gunar@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Microbiological environmental monitoring programmes for clean rooms for pharmaceutical production vary depending on the regulatory document. This is particularly evident in the experimental conditions, including the culture media used for sampling, as well as the temperature and time of incubation. To harmonise quality control procedures, it is necessary to develop a unified strategy for processing microbiological samples.

AIM. This study aimed to investigate the optimal conditions for sample incubation during microbiological monitoring of clean rooms.

MATERIALS AND METHODS. The study compared several culture conditions for indicator microorganisms, including *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* F-62, *Aspergillus terreus* F-1269, and *Penicillium chrysogenum* F-3 (the latter three strains were obtained from the Russian National Collection of Industrial Microorganisms), as well as for environmental isolates, including *Staphylococcus epidermidis*, *Kocuria rosea*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus* spp., and *Sphingomonas paucimobilis*. The culture media used were trypticase soy agar (TSA), Sabouraud's dextrose chloramphenicol agar (SDCA), and Reasoner's 2A agar (R2A). The incubation regimes used were as follows: 2 days at 30–35 °C and then 3 days at 20–25 °C; 3 days at 20–25 °C and then 2 days at 30–35 °C; 48–72 hours at 30–35 °C (for aerobic bacteria); 5–7 days at 20–25 °C (for yeasts and moulds).

RESULTS. The comparison showed no statistically significant differences between the results obtained with TSA and R2A under different temperature conditions. The germination rates of environmental isolates grown on TSA were significantly lower (by 19–37%) in the two-tiered incubation scheme that started at a lower temperature. The study identified groups of microorganisms requiring special culture conditions for microbiological environmental monitoring (bacteria with suppressed physiological functions and moulds).

CONCLUSIONS. The study confirmed the need to standardise microbiological testing used in environmental monitoring and to provide for its proper regulation by drafting a general monograph on the matter. The authors demonstrated the applicability of both TSA and R2A as culture media for microbiological environmental monitoring. Currently, the use of a two-tiered incubation scheme with one non-selective culture medium requires validation on a case-by-case basis. Although the sequence of temperature levels did not affect the germination rates of microorganisms significantly, the incubation regime starting at a higher temperature (30–35 °C) was determined as preferable for bacterial environmental isolates.

Keywords: microbiological monitoring; incubation; two-tiered incubation scheme; temperature regime; clean rooms; culture media; trypticase soy agar; Reasoner's 2A agar; moulds

For citation: Gunar O.V., Sakhno N.G., Tyncherova O.S. Comparison of incubation conditions for microbial contaminant isolation in microbiological environmental monitoring. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(4):483–492. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-4-483-492>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022300127-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Микробная контаминация лекарственных средств (ЛС), снижающая их эффективность и безопасность применения, может возникнуть на любой стадии производственного процесса. Ключевым инструментом обнаружения и снижения потенциальных производственных рисков контаминации является микробиологический мониторинг, представляющий собой комплекс мероприятий, направленных на обеспечение контроля состояния критически важных параметров окружающей среды и систем фармацевтического предприятия (персонала, воздуха, поверхностей, систем подготовки сжатого воздуха и воды и др.). Необходимость разработки единой научно обоснованной программы микробиологического мониторинга подчеркивается в нескольких отраслевых руководствах¹, однако имеющиеся в различных национальных и международных нормативных документах практические рекомендации по процедуре проведения исследований различаются. Единая стратегия обработки проб, исследуемых в рамках микробиологического мониторинга, в настоящее время отсутствует.

Наиболее значимыми источниками микробного загрязнения являются персонал, рабочие поверхности, воздух, вода [1–4]. Для каждого из них можно определить характерный видовой состав микрофлоры. Так, более 50% всех изолятов представляют собой аборигенные для человека виды грамположительных кокков (например, *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Kocuria* spp.) [1]. Источником грамотрицательных бактерий, таких как *Pseudomonas* spp., *Burkholderia cepacia*,

Ralstonia pickettii и др., как правило, является вода [5]. *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., дрожжевые грибы *Saccharomyces* spp., *Rhodotorula rubra*, а также плесневые грибы *Aspergillus* spp. и *Penicillium* spp. наиболее часто обнаруживаются в образцах воздуха и на поверхностях [4–6]. Очевидно, оптимальные условия жизнедеятельности каждого из этих микроорганизмов различаются, и учесть их при микробиологическом мониторинге довольно сложно.

Цель работы – определение оптимальных условий инкубации посевов при микробиологическом мониторинге «чистых» помещений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При планировании эксперимента было проведено изучение отечественной и зарубежной нормативной документации, регламентирующей асептические процессы в фармацевтическом производстве², а также процедуру микробиологического мониторинга производственных «чистых» помещений³.

В работе использовали тест-штаммы бактерий, дрожжевых и плесневых грибов, депонированные в официальных коллекциях: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* ВКПМ F-62, *Aspergillus terreus* ВКПМ F-1269, *Penicillium chrysogenum* ВКПМ F-3. Помимо этого использовали бактерии, выделенные из окружающей среды и идентифицированные с помощью анализатора бактериологического Vitek2Compact30 (Biomerieux): *Staphylococcus epidermidis*, *Kocuria rosea*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus* spp., *Sphingomonas paucimobilis*.

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики». Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 01.03.2021 № 6 «О Руководстве по асептическим процессам в фармацевтическом производстве».

МУК 4.2.734-99. 4. Методы контроля. Микробиологический мониторинг производственной среды. Методические указания.

² Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 01.03.2021 № 6 «О Руководстве по асептическим процессам в фармацевтическом производстве»

³ МУК 4.2.734-99. 4. Методы контроля. Микробиологический мониторинг производственной среды. Методические указания.

Все работы производили в контролируемых условиях шкафа ламинарного Purifier Logic A2 (Labconco corp.).

Культуры, выращенные на скошенной агаризованной среде в течение 24 ч, смывали с помощью стерильного раствора натрия хлорида 0,9%, стандартизовали с использованием оптического стандарта мутности ВОЗ 10 ЕД и доводили до требуемой концентрации методом серийных разведений. Посев производили поверхностным чашечным агаровым методом на готовые к применению питательные среды: триптиказо-соевый агар (TSA) (Biomerieux, кат. № 41466), агар Сабуро с декстрозой и хлорамфениколом (SDCA) (Biomerieux, кат. № 42620), а также агар Ризонера (R2A), приготовленный в лаборатории из сухой питательной среды (Liofilchem S.r.l, кат. № 610129) в трехкратной повторности.

Инкубацию посевов проводили в инкубаторах BD-240 и KB-115 (Binder) в следующих условиях:

- режим «33→23 °C» – 2 сут при 30–35 °C, затем 3 сут при 20–25 °C;
- режим «23→33 °C» – 3 сут при 20–25 °C, затем 2 сут при 30–35 °C;
- режим «33 °C» – 48–72 ч при 30–35 °C (культтивирование аэробных бактерий);
- режим «23 °C» 5–7 сут при 20–25 °C (культтивирование дрожжевых и плесневых грибов).

Для получения статистически значимых результатов эксперименты выполняли многократно ($n \geq 6$) в условиях внутрилабораторной прецизионности: при сравнении питательных сред TSA и R2A для каждого температурного режима было выполнено 8 определений; коэффициент прорастания микроорганизмов (K_{np} , %) на триптиказо-соевом агаре при разных режимах инкубирования рассчитывали по результатам 8 определений; изучение динамики роста бактерий *K. rosea* выполняли в ходе 6 определений; выявление оптимальных условий культуры плесневых грибов проводили с использованием массива данных нескольких определений, содержащих не менее 35 единичных значений для каждого режима инкубации.

Посевы просматривали ежедневно, по окончании срока инкубации выполняли подсчет колоний с помощью счетчика Scan 100 (Interscience).

Перед статистической обработкой результатов проводили оценку их нормальности с помощью теста Шапиро–Уилка ($\alpha=0,05$) и на основании полученных данных выбирали

инструмент для выполнения дисперсионного анализа ($P=95\%$): односторонний ANOVA или тест Краскела–Уоллиса. При обнаружении статистически значимых различий между группами проводили попарные сравнения с использованием апостериорных критериев Тьюки–Крамера или Данна соответственно.

Коэффициент прорастания K_{np} микроорганизмов рассчитывали по формуле (1).

$$K_{np} = \frac{N_i}{N_0}, \quad (1)$$

где N_i – количество колоний, выросших при двухтемпературной схеме инкубации, N_0 – количество колоний, выросших в условиях инкубации при постоянной температуре, выбранной с учетом вида микроорганизма.

Удельную скорость роста штамма ($\mu, \text{ч}^{-1}$) определяли по формуле (2), время удвоения концентрации микробных клеток ($T_d, \text{ч}$) – по формуле (3).

$$\mu = 2,3 \cdot \frac{\lg X / \lg X_0}{t}, \quad (2)$$

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}, \quad (3)$$

где X_0 и X – начальная и конечная концентрации клеток ($\text{КОЕ}/\text{см}^3$); t – время культуры микроорганизмов (ч).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение нормативной документации. Представленные в нормативных документах требования, регламентирующие условия проведения микробиологического мониторинга, в том числе питательные среды, температуру и длительность инкубации посевов, существенно отличаются (табл. 1).

Влияние питательной среды и температуры инкубирования на выделение бактерий. Как показывают некоторые исследования, наиболее эффективной питательной средой для выделения широкого спектра бактерий и грибов из окружающей среды фармацевтического производства является триптиказо-соевый агар (TSA) [7–9]. В отдельных работах подчеркивается возможность применения агара Ризонера (R2A) для оценки загрязнения воздуха [10, 11]. Данная питательная среда была создана для стимулирования роста медленнорастущих гетеротрофных бактерий и нашла широкое применение при анализе воды [12–14].

В настоящей работе выполнено экспериментальное сравнение питательных сред TSA

Таблица 1. Питательные среды и режимы инкубации посевов образцов микробиологического мониторинга**Table 1.** Culture media and incubation regimes for microbiological monitoring samples

Нормативный документ <i>Regulatory document</i>	Питательные среды* <i>Culture media*</i>	Условия инкубации <i>Incubation conditions</i>
Рекомендация Коллегии ЕЭК от 01.03.2021 № 6 ^a <i>Recommendation No. 6 of the EEC Board dated 03/01/2021</i>	Неселективные фармакопейные или эквивалентные им готовые питательные среды <i>Non-selective pharmacopoeial or equivalent ready-to-use culture media</i>	30–35 °C, 48–72 ч (выделение аэробных бактерий)**; 20–25 °C, 5–7 сут (выделение дрожжевых и плесневых грибов) <i>30–35 °C, 48–72 h (isolation of aerobic bacteria)**;</i> <i>20–25 °C, 5–7 days (isolation of yeasts and moulds)</i>
ГОСТ ИСО 14698-1-2005 ^b <i>GOST ISO 14698-1-2005</i>	Неселективные питательные среды <i>Non-selective culture media</i>	2–5 сут (выделение бактерий); 5–7 сут (выделение грибов) <i>2–5 days (isolation of bacteria);</i> <i>5–7 days (isolation of yeasts and moulds)</i>
МУК 4.2.734-99 ^c <i>MUK 4.2.734-99</i>	Среда № 1 (выделение бактерий); среда № 2 (агар Сабуро) – выделение грибов <i>Culture medium 1 (isolation of bacteria);</i> <i>Culture medium 2 (Sabouraud's agar) (isolation of fungi)</i>	30–35 °C, 48 ч 20–25 °C, 72 ч <i>30–35 °C, 48 h</i> <i>20–25 °C, 72 h</i>
USP <1116> ^d	Соево-казеиновая питательная среда; агар Сабуро, модифицированный агар Сабуро или агар, ингибирующий рост плесневых грибов; селективная питательная среда <i>Soybean-casein digest medium (SCDM);</i> <i>Sabouraud's agar, modified Sabouraud's agar, or inhibitory mould agar;</i> <i>selective media</i>	20–35 °C, не менее 72 ч (аэробные и/или анаэробные условия)***; двуэтапная схема инкубации, сначала при более высокой температуре; требования технической документации селективной питательной среды <i>20–35 °C, ≥72 h (aerobic and/or anoxic conditions)***;</i> <i>two-tiered incubation scheme, starting at a higher temperature;</i> <i>technical requirements for selective culture media</i>
PDA Technical report No. 13 ^e	Соево-казеиновая питательная среда или триптиказо-соевый агар; агар Сабуро или модифицированный агар Сабуро; триптиказо-соевый бульон (для тампонных проб при мониторинге в помещениях класса А) <i>Soybean-casein digest medium (SCDM) or trypticase soy agar (TSA)</i> <i>Sabouraud's agar or modified Sabouraud's agar;</i> <i>Tryptic soy broth (for swabs performed in Grade A clean rooms)</i>	30–35 °C, 48–72 ч (аэробные и/или анаэробные условия)***; 20–25 °C, 5–7 сут*** 1) двухэтапная схема инкубации, сначала при низкой температуре; 2) несколько схем инкубации <i>30–35 °C, 48–72 h (aerobic and/or anoxic conditions)***;</i> <i>20–25 °C, 5–7 days***</i> 1) two-tiered incubation scheme, starting at a lower temperature; 2) multiple incubation schemes

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

^a Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 01.03.2021 № 6 «О Руководстве по асептическим процессам в фармацевтическом производстве».*Recommendation No. 6 of the Board of the Eurasian Economic Commission (EEC) dated 03/01/2021 On the Guidelines for aseptic processes in pharmaceutical production.*^b ГОСТ ИСО 14698-1-2005 Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Контроль биозагрязнений. Часть 1. Общие принципы и методы.*Russian State Standard GOST ISO 14698-1-2005 Clean rooms and associated controlled environments. Biocontamination control. Part 1. General principles and methods.*^c МУК 4.2.734-99. 4. Методы контроля. Микробиологический мониторинг производственной среды. Методические указания.
Russian Methodological Guidelines MUK 4.2.734-99 Control methods. Microbiological environmental monitoring. Methodological guidelines.^d USP <1116> Microbiological control and monitoring of aseptic processing environments.^e PDA Technical Report No. 13 Revised 2022 (TR 13) Fundamentals of an Environmental Monitoring Program.**Примечание.** * – могут содержать нейтрализаторы; ** – срок инкубации может быть обоснованно сокращен или увеличен; *** – срок инкубации может быть увеличен для выделения медленнорастущих видов.**Note.** * may contain neutralisers; ** may be reasonably shortened or extended; *** may be extended to isolate slow-growing species.

и R2A для выделения микроорганизмов (тест-штаммов бактерий, дрожжевых и плесневых грибов, а также изолятов из окружающей среды), в ходе которого не было выявлено статистически значимых различий полученных

результатов (рассчитанное значение критерия Фишера $F_t=1,28$ не превышало табличное $F_t(0,05;52;52)=1,59$). Однако объективная оценка влияния состава питательной среды невозможна без учета температурных условий инкубации.

В настоящее время в практику фармацевтических микробиологов вводится использование двух-температурной схемы инкубации [15], несмотря на то что при низкой температуре, поддерживающей на первом этапе инкубации, может подавляться рост грамположительных кокков⁴. Следует отметить, что в настоящем исследовании подавления роста бактерий не наблюдалось (табл. 2).

Проведенное сравнение показало отсутствие статистически значимых различий между выборочными средними значениями всех групп

полученных результатов (рассчитанное значение критерия Фишера ($F_c=0,19$) меньше табличного $F_t=2,44$) (табл. 2). Ни температурный режим инкубации, ни используемая питательная среда не оказывали влияние на выделение (рост) изучаемых в настоящей работе бактерий. Сравнение количества бактерий, выросших на TSA при разных режимах инкубации, выявило, что коэффициент прорастания бактерий, выделенных из окружающей среды, существенно различался (на 19–37%) в зависимости от температурных условий (табл. 3). В качестве критерия

Таблица 2. Результаты инкубирования бактериальных культур в различных условиях

Table 2. Effects of different incubation conditions on bacterial cultures

Параметр <i>Parameter</i>	Условия культивирования <i>Culture conditions</i>					
	Триптиказо-соевый агар (TSA) <i>Trypticase soy agar</i>			Агар Ризонера (R2A) <i>Reasoner's 2A agar</i>		
	33 °C	33→23 °C	23→33 °C	33 °C	33→23 °C	23→33 °C
Нормальность <i>Normality</i>	0,65	0,58	0,98	0,13	0,06	0,67
Среднее ($n=8$), КОЕ <i>Mean (n=8), CFU</i>	38,63	35,50	33,63	36,13	32,00	37,50
Стандартное отклонение (S) <i>Standard deviation (S)</i>	10,08	15,03	9,71	15,55	26,75	10,99

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. В эксперименте использовали тест-штаммы *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; изолятами *Bacillus* spp., *Sphingomonas paucimobilis*; n – размер выборки

Note. The experiment used *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, and *Pseudomonas aeruginosa* test strains and *Bacillus* spp. and *Sphingomonas paucimobilis* environmental isolates. n , sample size

Таблица 3. Коэффициент прорастания микроорганизмов на триптиказо-соевом агаре при разных режимах инкубирования (размер выборки, $n=6$)

Table 3. Germination rates of microorganisms on trypticase soy agar under different incubation regimes (sample size, $n=6$)

Микроорганизм <i>Microorganism</i>	Коэффициент прорастания микроорганизмов <i>Microorganism germination rate</i> K_{np} , %	
	Режим инкубации посевов <i>Culture incubation regime</i>	
	33→23 °C	23→33 °C
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	106	106
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	96	92
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	97	93
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98	161
<i>Kocuria rosea</i>	42	5
<i>Micrococcus luteus</i>	102	75
<i>Bacillus</i> spp.	111	86
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	132	113

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

⁴ USP <1116> Microbiological control and monitoring of aseptic processing environments.

приемлемости при интерпретации полученных данных (табл. 3) использовали значение «не менее 70%»⁵. Обнаружено, что лишь в случае бактерии *K. rosea* установленное требование не выполнялось.

Динамика роста бактерий *K. rosea*, выделенных из окружающей лабораторной среды.

Микроорганизмы, присутствующие в окружающей среде фармацевтического производства, находятся под воздействием различных физических, химических или биологических факторов. Влияние стрессовых условий приводит к запуску адаптационных механизмов и вызывает краткосрочные или долгосрочные изменения физиологии микробных клеток [16–19]. Одним из примеров служит более продолжительная лаг-фаза у выделенных микроорганизмов по сравнению с музеиными штаммами [20]. Как следствие, для роста производственных изолятов требуется немного более длительный период культивирования (на 2–4 сут) [20].

Температура является важным фактором регулирования роста микроорганизмов, поскольку она напрямую влияет на различные клеточные компоненты и метаболические процессы. Некоторые внутриклеточные биомолекулы, такие как ДНК, РНК, липиды и белки, могут служить бактериям в качестве термосенсоров, позволяющих детектировать изменение температуры окружающей среды [23–25]. Патогенные микроорганизмы (например, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp. и др.) используют такие механизмы восприятия температуры для запуска экспрессии генов вирулентности, контроля подвижности и развития биопленок [24–26]. Среди механизмов адаптации выделяют индукцию белков теплового (холодового) шока, которая, в свою очередь, приводит к модификациям клеточной мембраны, изменению ферментативной активности и транспорта

питательных веществ, а также к снижению скорости роста [8, 17–20].

В настоящей работе был использован выделенный из окружающей лабораторной среды штамм *K. rosea*, характеризующийся замедленным ростом.

Микроорганизмы *K. rosea* способны расти при 10–45 °C, оптимальным температурным диапазоном является 20–30 °C [21, 22]. В этих условиях наблюдается максимальная удельная скорость роста, а также выработка молекулярных факторов устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды [22]. Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о том, что наиболее подходящими условиями культивирования микроорганизмов с угнетенными физиологическими функциями и замедленным ростом, к которым можно отнести изучаемый изолят *K. rosea*, является инкубация на питательной среде TSA при одной температуре 30–35 °C не менее 5 сут, что подтверждается динамикой роста (табл. 4, рис. 1).

Определение оптимальных условий роста плесневых грибов. Одним из показателей качества воздуха производственной (лабораторной) среды является содержание плесневых грибов в пробах микробиологического мониторинга [27–29]. Для выделения грибов, как правило, используют рекомендованные рядом нормативных документов специальные микологические среды, такие как агар с экстрактом солода и агар Сабуро (с добавлением антибиотиков или без них) (табл. 1). Для большинства грибов-изолятов окружающей среды «чистых» помещений (например, *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Trichophyton* spp., *Penicillium* spp.), а также некоторых комменсалов кожи человека (*Malassezia* spp.) температурный оптимум роста (T_{opt}) находится в диапазоне 20–25 °C [15]. Другие виды, например

Таблица 4. Кинетика роста *Kocuria rosea* на триптиказо-соевом агаре при разных режимах инкубации

Table 4. Time course of *Kocuria rosea* growth on trypticase soy agar under different incubation regimes

Параметр <i>Parameter</i>	Условия инкубации <i>Incubation conditions</i>		
	33 °C	33→23 °C	23→33 °C
Удельная скорость роста (μ , ч ⁻¹) <i>Specific growth rate</i> (μ , h ⁻¹)	0,058	0,056	0,049
Время удвоения концентрации (T_d , ч) <i>Concentration doubling time</i> (T_d , h)	11,95	12,38	14,15

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

⁵ ОФС.1.1.0021.18 Валидация микробиологических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

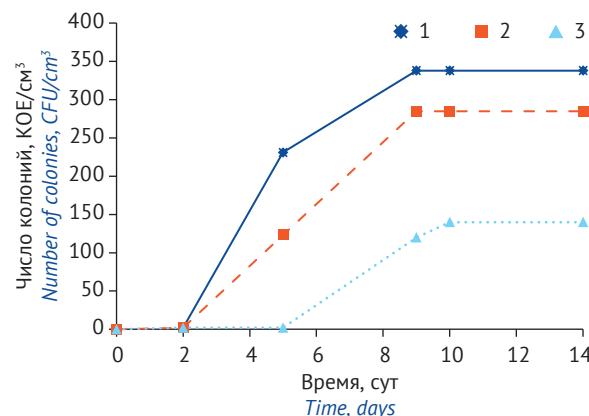


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Динамика роста *Kocuria rosea* при различных температурных режимах: 1 – постоянная температура 33 °C, 2 – уменьшение температуры 33→23 °C, 3 – увеличение температуры 23→33 °C

Fig. 1. Time course of *Kocuria rosea* growth under different incubation regimes: 1, constant temperature (33 °C); 2, decrease of temperature (33→23 °C); 3, increase of temperature (23→33 °C)

Aspergillus spp., демонстрируют лучшие показатели роста при 30 °C и выше [29].

По данным I. Symonds et al. [7] оптимальной температурой роста мезофильных неспорообразующих бактерий является 30–35 °C, тогда как наилучшее восстановление дрожжевых и плесневых грибов и спорообразующих бактерий происходит при 20–25 °C. Использование двухтемпературной инкубации (при 20–25 °C в течение 3 сут с последующей инкубацией при 30–35 °C в течение 2 сут) приводило к снижению количества выделяемых бактерий и грибов. Эти результаты согласуются с данными, полученными O. Gordon et al. [9], которые показали, что восстановление микроорганизмов

при однотемпературных режимах инкубации происходит гораздо лучше, чем при двухтемпературной инкубации с первоначальной температурой 20–25 °C. Помимо этого, авторами было продемонстрировано, что восстановление грибов и дрожжей происходит более эффективно при температуре 20–25 °C.

Экспериментальное сравнение различных условий инкубации (табл. 5) выявило статистически значимое различие результатов количественного определения плесневых грибов: рассчитанное значение критерия Краскела–Уоллиса $H_c=14,24$ превышает его табличное значение $H_t=9,49$; $p=0,007$. Апостериорное попарное сравнение, выполненное с помощью критерия Данна (корректированное с помощью поправки Бонферрони значение $\alpha=0,005$), показало, что средние ранги существенно отличаются в группах 1 и 3, а также в группах 3 и 5. Это свидетельствует о том, что инкубация в условиях однотемпературного режима при температуре 33 °C на питательной среде TSA не позволяет объективно оценить количественное содержание плесневых грибов. При этом наибольшее медианное количество колоний наблюдалось при использовании агара Сабуро.

ВЫВОДЫ

1. На основании анализа нормативно-правовой документации, устанавливающей для микробиологического мониторинга различные температурные режимы инкубации посевов на различных питательных средах, установлена необходимость стандартизации рассматриваемого процесса и его регламентация в установленном порядке в виде общей фармакопейной статьи.

Таблица 5. Сравнение условий инкубации посевов плесневых грибов

Table 5. Comparison of incubation conditions for mould cultures

Параметр Parameter	Условия культивирования <i>Culture conditions</i>				
	Триптиказо-соевый агар <i>Trypticase soy agar</i>				Агар Сабуро <i>Sabouraud's agar</i>
	1	2	3	4	
	33→23 °C	23→33 °C	33 °C	23 °C	23 °C
Медиана, КОЕ <i>Median, CFU</i>	36	32	26	30	37
Размер выборки (<i>n</i>) <i>Sample size (n)</i>	38	39	35	35	41
Средний ранг <i>Mean rank score</i>	104,14	85,35	60,57	89,96	102,93

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

2. Показана возможность использования при микробиологическом мониторинге в качестве питательной среды как триптиказо-соевого агара, так и агара Ризонера.
3. Применение двухтемпературной схемы инкубации с использованием одной неселективной питательной среды (например, TSA или R2A) в настоящее время документально не закреплено и требует валидации в каждом конкретном

случае. В рамках выполненного исследования показано, что при культивировании тест-штаммов последовательность изменения температуры не оказывает влияния на коэффициент их прорастания (92–106%). Однако в случае бактерий, выделенных из окружающей среды, предпочтительным следует считать режим инкубации с более высокой температурой (30–35 °C) на начальном этапе инкубации.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sandle T. A review of cleanroom microflora: types, trends, and patterns. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2011;65(4):392–403. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2011.00765>
2. Jimenez L. *Microbial contamination control in the pharmaceutical industry*. Taylor & Francis; 2004. <https://doi.org/10.1201/9780203026267>
3. Jimenez L. Analysis of FDA enforcement reports (2012–2019) to determine the microbial diversity in contaminated non-sterile and sterile drugs. *Am Pharm Rev.* 2019;21:48–73.
4. Griffith C. Surface sampling and the detection of contamination. In: *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry*. 2016. P. 673–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00044-3>
5. Jimenez L. Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2007;61(5):383–99. PMID: 18047177
6. Obuekwe CO, Obuekwe IF, Rafiq M. Surface microbial contamination in some commonly available tablet dosage forms. *Med Princ Pract.* 2001;9(4):290–9. <https://doi.org/10.1159/000054256>
7. Symonds I, Martin D, Davies M. Facility-based case study: a comparison of the recovery of naturally occurring species of bacteria and fungi on semi-solid media when incubated under standard and dual temperature conditions and its impact on microbial environmental monitoring approach. *Eur J Parenter Pharm Sci.* 2016;21(1):7–15.
8. Weissfeld AS, Joseph RA, Le TV, Trevino EA, Schaeffer MF, Vance PH. Optimal media for use in air sampling to detect cultivable bacteria and fungi in the pharmacy. *J Clin Microbiol.* 2013;51(10):3172–5. <https://doi.org/10.1128/JCM.00944-13>
9. Gordon O, Berchtold M, Staerk A, Roesti D. Comparison of different incubation conditions for microbiological environmental monitoring. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2014;68(5):394–406. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2014.00994>
10. Dziurzynski M, Ciuchcinski K, Dyda M, Szych A, Drabik P, Laudy A, et al. Assessment of bacterial contamination of air at the Museum of King John III's Palace at Wilanow (Warsaw, Poland): selection of an optimal growth medium for analyzing airborne bacteria diversity. *Appl Sci.* 2020;10(20):7128. <https://doi.org/10.3390/app10207128>
11. Hyvärinen AM, Martikainen PJ, Nevalainen AI. Suitability of poor medium in counting total viable airborne bacteria. *Grana.* 1991;30(2):414–17. <https://doi.org/10.1080/00173139109432000>
12. Cao X, Xiong H, Fan Y, Xiong L. Comparing the effects of two culture methods to determine the total heterotrophic bacterial colony count in hospital purified water. *J Epidemiol Glob Health.* 2024;14(1):184–92. <https://doi.org/10.1007/s44197-023-00186-1>
13. Bugno A, Almodóvar AAB, Pereira TC. Enumeration of heterotrophic bacteria in water for dialysis: Comparison of the efficiency of Reasoner'2 agar and plate count agar. *Braz J Microbiol.* 2010;41(1):15–8. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100003>
14. Ćirić S, Olga P, Milenović D. Low-nutrient R2A medium in monitoring microbiological quality of drinking water. *Chem Ind Chem Eng Q.* 2010;16(1):39–45. <https://doi.org/10.2298/CICEQ090603004C>
15. Sandle T. Examination of the order of incubation for the recovery of bacteria and fungi from pharmaceutical-grade cleanrooms. *Int J Pharm Compd.* 2014;18(3):242–7. PMID: 25306772.
16. Tan YS, Zhang RK, Liu ZH, Li BZ, Yuan YJ. Microbial adaptation to enhance stress tolerance. *Front Microbiol.* 2022;13:888746. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.888746>
17. Schumann W. Function and regulation of temperature-inducible bacterial proteins on the cellular metabolism. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2000;67:1–33. https://doi.org/10.1007/3-540-47865-5_1
18. Dasila H, Maithani D, Suyal DC, Debbarma P. Cold-adapted microorganisms: survival strategies and biotechnological significance. In: Goel R., Soni R., Suyal DC, Khan M, eds. *Survival strategies in cold-adapted microorganisms*. Singapore: Springer; 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-16-2625-8_16
19. Sagini JPN, Ligabue-Braun R. Fungal heat shock proteins: molecular phylogenetic insights into the host takeover. *Sci Nat.* 2024;111(2):16. <https://doi.org/10.1007/s00114-024-01903-x>
20. Sandle T. Examination of the growth rates of environmental isolates compared with compendial strains. *EJPPS Eur J Parenter Pharm Sci.* 2022:272. <https://doi.org/10.37521/ejpps.27201>
21. Nudelman BG, Ouellette T, Nguyen KQ, Schmaus WH, Chokshi RR. *Kocuria rosea* bacteremia in a sickle cell patient: a case report. *Cureus.* 14(9):e28870. <https://doi.org/10.7759/cureus.28870>
22. Timkina E, Drábová L, Palyzová A, Řezanka T, Matátková O, Kolouchová I. *Kocuria* strains from unique radon spring water at Jachymov spa. *Fermentation.* 2022;8(1):35. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010035>
23. Samtani H, Unni G, Khurana P. Microbial mechanisms of heat sensing. *Indian J Microbiol.* 2022;62(2):175–86. <https://doi.org/10.1007/s12088-022-01009-w>
24. Almlöd H, Randall TE, Liu F, Leblanc K, Groves RA, Kittichotirat W, et al. Bacterial cyclic diguanylate signaling networks sense temperature. *Nat Commun.* 2021;12(1):1986. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22176-2>

25. Moon S, Ham S, Jeong J, Ku H, Kim H, Lee C. Temperature matters: bacterial response to temperature change. *J Microbiol.* 2023;61(3):343–57.
<https://doi.org/10.1007/s12275-023-00031-x>
26. Solar Venero EC, Galeano MB, Luqman A, Ricardi MM, Serral F, Fernandez Do Porto D, et al. Fever-like temperature impacts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* interaction, physiology, and virulence both *in vitro* and *in vivo*. *BMC Biol.* 2024;22:27.
<https://doi.org/10.1186/s12915-024-01830-3>
27. Masia MD, Dettori M, Deriu GM, Soddu S, Deriu M, Arghittu A, et al. Microbial monitoring as a tool for prevent-
- ing infectious risk in the operating room: results of 10 years of activity. *Atmosphere.* 2021;12(1):19.
<https://doi.org/10.3390/atmos12010019>
28. Tomazin R, Matos T. Mycological methods for routine air sampling and interpretation of results in operating theaters. *Diagnostics.* 2024;14(3):288.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics14030288>
29. Vijayakumar R, Sandle T, Manoharan C. A review of fungal contamination in pharmaceutical products and phenotypic identification of contaminants by conventional methods. *EJPPS Eur J Parenter Pharm Sci.* 2012;17(1):4–19.

Вклад авторов. Авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Н.Г. Сахно – подбор и анализ материалов литературы, выполнение эксперимента, написание текста рукописи; О.С. Тынчерова – выполнение эксперимента; О.В. Гунар – идея исследования, редактирование и критический пересмотр текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Nadezhda G. Sakhno selected and analysed literature, performed the experiments, and drafted the manuscript. Olga S. Tyncherova performed the experiments. Olga V. Gunar conceived the idea of research, edited the manuscript, and critically reviewed it.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Гунар Ольга Викторовна, д-р фарм. наук / Olga V. Gunar, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4825-8356>

Сахно Надежда Геннадьевна, канд. фарм. наук / Nadezhda G. Sakhno, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1773-7423>

Тынчерова Ольга Сергеевна / Olga S. Tyncherova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-7494-3403>

Поступила 17.06.2024

После доработки 17.07.2024

Принята к публикации 21.08.2024

Received 17 June 2024

Revised 17 July 2024

Accepted 21 August 2024