Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* БРЦ ВКПМ Y-4394 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3567—19

Издание официальное

Москва • 2020

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* БРЦ ВКПМ Y-4394 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3567—19

ББК 51.24я8
М54

М54 **Метод** микробиологического измерения концентрации *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* БРЦ ВКПМ Y-4394 в воздухе рабочей зоны: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020.—8 с.

ISBN 978–5–7508–1720–7

1. Разработаны и подготовлены ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (д.б.н. Н. И. Шеина).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 24 октября 2019 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.24я8

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 28.01.20

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,5

Тираж 100 экз. Заказ 2

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
Федеральным центром гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19А
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 633-86-59

© Роспотребнадзор, 2020

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
24 октября 2019 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* БРЦ ВКПМ Y-4394 в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.2.3567—19

I. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания (далее – МУК) устанавливают порядок применения метода микробиологического количественного анализа концентрации *Komagataella (Pichia) pastoris* БРЦ ВКПМ Y-4394 в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 до 50 000 клеток в 1 $м^3$ воздуха.

1.2. МУК предназначены для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль микробиологического загрязнения воздушной среды, а также санитарных лабораторий биотехнологических предприятий, микробиологических лабораторий, научно-исследовательских организаций, работающих в области гигиены окружающей среды и аккредитованных в установленном порядке на проведение микробиологических исследований.

1.3. МУК носят рекомендательный характер.

II. Биологическая характеристика штамма *Komagataella (Pichia) pastoris* БРЦ ВКПМ Y-4394 и его гигиенический норматив в воздухе рабочей зоны

2.1. Штамм *Komagataella (Pichia) pastoris* БРЦ ВКПМ Y-4394, включающий рекомбинантный фрагмент ДНК, предполагается использовать в промышленном производстве фермента ксиланазы для кормовых целей.

Мезофил. Хороший рост штамма наблюдается через 24 часа при 25—28 °С на глюкозо-пептонном агаре (ГПА).

Штамм растет также на агаризованных средах – глюкозо-пептон-дрожжевом агаре (YPD), глицерин-пептон-дрожжевом агаре (YPG), мясопептонном агаре (МПА), АГВ среде, картофельный агаре (КА).

При росте на агаризованной среде образуются гладкие, округлые колонии с матовой поверхностью светло-бежевого цвета, край ровный. При росте в жидкой среде клетки образуют ровную интенсивную муть, пристеночных пленок не образуют, наблюдается белый осадок, коагуляция отсутствует.

На среде YPD штамм образует клетки округлой, слегка овальной формы размером 3—4 мкм, клетки почкуются, почкование многостороннее, истинного мицелия не образуют.

Штамм *Komagataella (Pichia) pastoris* депонирован в Биоресурсном Центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером БРЦ ВКПМ Y-4394.

Штамм *Komagataella (Pichia) pastoris* БРЦ ВКПМ Y-4394 относится к микроорганизмам, непатогенным для человека согласно классификации микроорганизмов, приведенных в санитарных правилах[1]. Работа со штаммом *Komagataella (Pichia) pastoris* БРЦ ВКПМ Y-4394 не требует специальных мер предосторожности.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) *Komagataella (Pichia) pastoris* в воздухе рабочей зоны установлена в гигиенических нормативах[2].

III. Пределы измерений

3.1. Методика обеспечивает выполнения измерений количества клеток гриба в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 до 50 000 клеток в 1 м^3 воздуха при доверительной вероятности 0,95.

IV. Методы измерений

4.1. Метод основан на аспирации из воздуха рабочей зоны клеток псевдомицелия и подсчета количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам.

V. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

5.1. При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы, указанные в табл. 1.

---

[1] СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

[2] ГН 2.2.6.3538—18 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в воздухе рабочей зоны».

Таблица 1

Средства измерений

Наименование средств измерения	Названия документов (ГОСТ, ТУ)
Барометр-анероид с диапазоном измерения атмосферного давления 5—790 мм рт. ст. и с пределом допустимой погрешности ± 2,5 мм рт. ст.	ТУ 2504-1799
Весы лабораторные, аналитические, наибольший предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности ± 0,2 мг	ГОСТ Р 53228
Колбы мерные 2-100-2, 2-250-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0, 2,0, 5,0, 10 $см^3$	ГОСТ 29227
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25 и 50 $см^3$	ГОСТ 1770
Термометр лабораторный шкальный, пределы измерения 0—55 °С	ТУ 25-2021.003
Прибор для микробиологического анализа воздуха, модель 818 (щелевой прибор Кротова) Импактор воздуха микробиологический «Флора-100»	ТУ 64-12791—77 ТУ 64-098-33—95

Примечание. Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

Таблица 2

Вспомогательные устройства и материалы

Наименование аппаратуры и материалов	Названия документов (ГОСТ, ТУ)
1	2
Шкаф сушильный стерилизационный, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 9452-010-00141798
Термостаты, позволяющие поддерживать рабочую температуру (28 ± 2) °С и (37 ± 2) °С	ТУ 9452-002-00141798
Автоклав электрический	ГОСТ 9586
Стерилизаторы паровые медицинские	ГОСТ Р ЕН 13060; ГОСТ Р 51935
Дистиллятор	ТУ 4952-007-33142130
Облучатель бактерицидный настенный	ТУ 9444-015-03965956
Холодильник бытовой	ГОСТ 26678
Микроскоп биологический с иммерсионной системой типа Биолам	ГОСТ 28489—90
Лупа с увеличением × 10	ГОСТ 25706
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932
Чашки биологические (Петри) или одноразовые из полимерных материалов	ГОСТ 23932

Продолжение табл. 2

1	2
Воронки конусные диаметром 40—45 мм	ГОСТ 25336
Груша резиновая	ТУ 9398-005-0576
Петля бактериологическая	—
Марля медицинская	ГОСТ 9412
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026

Примечание. Допускается применение оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

Таблица 3

Реактивы и питательные среды

Наименование реактивов и питательных сред	Названия документов (ГОСТ)
Агар микробиологический	ГОСТ 17206
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Глюкоза	ГОСТ 6038
Пептон сухой ферментативный	ГОСТ 13805
Спирт этиловый технический	ГОСТ 17299
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ Р 51652; ГОСТ 18300
Дрожжевой экстракт, сухой	ГОСТ 17206-84

Примечание. Допускается использование других питательных сред и диагностических препаратов с аналогичными характеристиками.

VI. Требования безопасности

6.1. Измерение концентрации клеток гриба в воздухе рабочей зоны осуществляется в соответствии с санитарными правилами[3]. Правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.005. Электробезопасность при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019 и инструкции по эксплуатации прибора.

6.2. Все виды работ с реактивами проводят только в вытяжном шкафу при работающей вентиляции, работа с биологическим материалом осуществляется в боксе, оборудованном бактерицидными лампами.

VII. Требования к квалификации операторов

7.1. К выполнению измерений и обработке их результатов допускают лиц с высшим или средним профессиональным образованием, прошедших соответствующую подготовку и имеющих навыки работы в области микробиологических исследований.

---

[3] СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

VIII. Условия измерений

8.1. Приготовление сред, подготовку к анализу проводят в следующих условиях:

– температура воздуха (20 ± 5) °С;
– атмосферное давление 760 ± 20 мм рт. ст.;
– влажность воздуха не более 80 %.

IX. Приготовление глюкозо-пептон-дрожжевого агара (YPD)

9.1. Для приготовления глюкозо-пептон-дрожжевого агара используют отдельные компоненты среды следующего состава (г/1 000 $см^3$): пептон – 10,0 г, глюкоза – 10,0 г, дрожжевой экстракт – 10,0 г, агар-агар – 15,0 г, дистиллированная вода – 1 000 $см^3$.

Сухие компоненты растворяют в 1 000 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают и нагревают до полного растворения агара.

Приготовленную среду разливают в стерильные колбы по 250—500 $см^3$ и автоклавируют при 121 °С в течение 15 мин.

Готовую среду хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8 °С не более 10 дней.

X. Проведение измерения

Отбор проб воздуха

10.1. Отбор проб воздуха проводят с учетом требований ГОСТ 12.1.005 и ГОСТ Р 8.563.

Для этого воздух аспирируют при помощи пробоотборника на поверхность плотной питательной среды в соответствии с технической документацией (инструкцией) на прибор. Время аспирации и объем отбираемого воздуха зависит от предполагаемой концентрации микроорганизма.

Аппарат перед каждым отбором пробы воздуха тщательно протирают 96° этиловым спиртом. Особенно тщательно обрабатывают поверхность подвижного диска и внутреннюю стенку прибора; наружную и внутреннюю стенку крышки. На подвижной диск устанавливают подготовленную чашку Петри со средой, одновременно снимая с нее крышку. Прибор закрывают. Соприкосновение крышки прибора со средой недопустимо (количество питательной среды в чашки вносят в соответствии с Инструкцией к прибору). После отбора пробы воздуха и остановки диска прибор открывают, быстро снимают чашку Петри и закрывают крышкой от данной чашки. На дне чашки Петри стеклографом отмечают точку контроля, время аспирации и дату отбора пробы.

Выполнение анализа

10.2. При выполнении анализа воздуха стерильную агаризованную среду (YPD) расплавляют, остужают до 50—60 °С и разливают в чашки Петри.

Контроль чистоты розлива проводят в соответствии с методическими указаниями[4]. Для этого чашки с застывшей средой помещают в

[4] Пункт 7.1.1 МУК 4.2.2316—08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

термостат при температуре 37 °С не менее чем на 18 часов. Проросшие чашки бракуют, стерильные чашки используют для контроля воздуха. Разлитую в чашки питательную среду хранят при температуре (2—8) °С не более 10 дней.

После отбора проб воздуха чашки Петри помещают в термостат с температурой (28 ± 2) °С. Через 1—3 суток производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам.

Ростовые свойства используемой питательной среды должны быть проверены до проведения анализа воздуха в соответствии методическими указаниями[5]. Для этого эталонный музейный штамм *Komagataella (Pichia) pastoris* БРЦ ВКПМ Y-4394 высевается на 2—3 чашки используемой среды.

Лиофилизованную культуру музейного штамма необходимо использовать 2—3 пассажа во избежание потери им заданных ростовых свойств.

XI. Вычисление результатов измерения

11.1. Расчет концентрации клеток производят по формуле:

$$K = (П \times 1000) / C \times T, \text{ кл/м}^3, \text{ где}$$

K – концентрация штамма в воздухе, кл/м^3;

$П$ – количество типичных колоний, выросших на чашке Петри;

1000 – коэффициент пересчета на 1 м^3 воздуха;

C – скорость аспирации воздуха, л/мин;

T – время аспирации, мин.

XII. Оформление результатов измерений

12.1. По окончании измерения и расчета концентрации клеток микроорганизма в воздухе должен быть составлен протокол (отчет), в котором представлена необходимая информация:

– о месте отбора пробы (название и адрес организации, производство, технологическая стадия, точка отбора пробы)

– о марке пробоотборника, который использовался исследователями, питательной среде и времени инкубации

– о лицах, производивших отбор проб воздуха, идентификацию штамма и расчет концентрации штамма.

Основные качественные и количественные параметры измерения представляются в виде табл. 4.

Таблица 4

Основные качественные и количественные параметры измерения

Дата проведения	№ пробы	Характеристика выросших колоний (количество типичных колоний)	Концентрация, кл/м^3	Соотношение с величиной ПДК

[5] МУК 4.2.2316—08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

gost.e-ecolog.ru