**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 атмосферном воздухе городских и сельских поселений

**Методические указания**
**МУК 4.2.3566—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 атмосферном воздухе городских и сельских поселений

**Методические указания**
**МУК 4.2.3566—19**

ББК 51.21
М54

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

ISBN 978–5–7508–

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 51.21**

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 28.01.2020

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,5

Тираж 100 экз. Заказ 3

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 атмосферном воздухе городских и сельских поселений

## Методические указания МУК 4.2.3566—19

## I. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода микробиологического количественного анализа концентрации *Komagataella (Pichia) pastoris* БРЦ ВКПМ Y-4394 в атмосферном воздухе городских и сельских поселений в диапазоне концентраций от 5 до 5000 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. Методические указания носят рекомендательный характер.

## II. Биологическая характеристика штамма *Komagataella (Pichia) pastoris* БРЦ ВКПМ Y-4394 и его гигиенический норматив в атмосферном воздухе городских и сельских поселений

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 атмосферном воздухе установлена в гигиенических нормативах[2].

## III. Пределы измерений

3.1. Методика обеспечивает выполнения измерений количества клеток в атмосферном воздухе городских и сельских поселений в диапазоне концентраций от 5 до 5000 клеток в 1 м$^3$ воздуха при доверительной вероятности 0,95.

## IV. Методы измерений

4.1. Метод основан на аспирации из атмосферного воздуха городских и сельских поселений 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 и материалы.

---

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

[2] ГН 2.1.6.3537—18 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в атмосферном воздухе городских и сельских поселений».

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)<br>Импактор воздуха микробиологический «Флора-100» | ТУ 64-12791—77<br>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;<br>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 |
| Чашки биологические (Петри) или одноразовые из полимерных материалов | ГОСТ 23932 |
| Воронки конусные диаметром 40—45 мм | ГОСТ 25336 |

Продолжение табл. 2

| 1 | 2 |
|---|---|
| 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 |

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

## VI. Требования безопасности

6.1. Измерение концентрации клеток гриба в атмосферном воздухе городских и сельских поселений осуществляется в соответствии с санитарными правилами[3]. Правила техники безопасности при работе с химическими реактивами регламентируются ГОСТ 12.1.005, электробезопасность при работе с электроустановками – ГОСТ 12.1.019 и инструкцией 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, оборудованным 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 в соответствии с требованиями ГОСТ 17.2.4.02 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