Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток дрожжевого гриба *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3323 – продуцента липазы в атмосферном воздухе населенных мест и воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.2715—10
МУК 4.2.2725—10

Издание официальное

Москва • 2011

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 клеток дрожжевого гриба *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3323 – продуцента липазы в атмосферном воздухе населенных мест и воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.2715—10
МУК 4.2.2725—10

ББК 51.21
М54

М54 **Метод** микробиологического измерения концентрации клеток дрожжевого гриба *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3323 – продуцента липазы в атмосферном воздухе населенных мест и воздухе рабочей зоны: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—16 с.

ISBN 978—5—7508—0955—4

1. Разработаны ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет (д.б.н. Н. И. Шеина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 10.06.2010 № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 4 августа 2010 г.

4. Введены в действие с 4 октября 2010 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

Редактор Е. В. Николаева
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 21.01.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,0

Тираж 200 экз. Заказ 13

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
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2011
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
4 августа 2010 г.
Дата введения: 4 октября 2010 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10291 – продуцента α-амилазы в атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания МУК 4.2.2725—10

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3323 – продуцента липазы в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 5 до 50 000 клеток в 1 $м^3$ воздуха.

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005—88 «ССБТ. Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования» и ГОСТ Р 8.563—96 «Методики выполнения измерений».

Методические указания предназначены для применения учреждениями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также лабораториями организаций, аккредитованными в установленном порядке на право проведения микробиологических исследований.

Методические указания одобрены и рекомендованы секцией «Гигиенические аспекты биотехнологии и микробного загрязнения окружающей среды» Проблемной комиссии «Научные основы гигиены окружающей среды».

2. Биологическая характеристика дрожжевого гриба *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3323 и его гигиенический норматив

Штамм *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3323 является продуцентом липазы. Штамм создан с помощью генетических методов в ГосНИИ генетика и депонирован в ВКПМ.

Для дрожжей данного вида липолитическая активность является таксономическим признаком. Оптимум температуры для продукции липазы дрожжами составляет 29 °С, pH среды 5,5. При температуре 42 °С не растет.

Способен расти в присутствии циклогексимида, обладает уреазной активностью, нитрат не использует, сахара не сбраживает. В роде один вид, известный своей способностью к интенсивному образованию липолитических и протеолитических ферментов. Телеоморфа – *Candida paralipolytica.* Встречается у человека и других млекопитающих, в зерне, маслинах и нефтепродуктах.

Систематическое положение микроорганизма

Класс	*Fungi imperfecti*
Порядок	*Blastomycetales*
Род	*Yarrowia*
Вид	*lipolytica*
Штамм	ВКПМ Y-3323

На LB-агаре на 2-е и 3-и сутки вырастают колонии белого цвета, сухие, круглые, поднимающиеся над агаром. Края колонии ровные, у старой культуры возможно образование складок и концентрических кругов различной плотности. Максимальный диаметр – 10—12 мм.

Клетки круглые, эллипсоидные или удлиненные. Бесполое размножение – многосторонним почкованием на узком основании. Образуется псевдомицелий или истинный мицелий, который может иногда распадаться на артроспоры. Аски не конъюгативные, образуются из диплоидных клеток гиф. Оболочка аска быстро растворяется. В аске 1—4 аскоспоры, шаровидные, полусферические или шляповидные.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воздухе рабочей зоны – 500 кл./м^3, пометка А.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнения измерений количества клеток плесневого гриба в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 5 до 50 000 клеток в 1 м^3 воздуха при доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Метод основан на аспирации из воздуха клеток дрожжевого гриба на поверхность агаризованной среды и подсчете выросших колоний по

типичным культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам на 3-и сутки.

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства и материалы.

5.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы

Импактор микробиологический «Флора-100»	ТУ 9443-001-05031637—2002
Прибор для бактериологического анализа воздуха, модель 818 (щелевой прибор Кротова)	ТУ 64-12791—77
Прибор MAS – 100 ECO фирмы «Merk» (Германия) для отбора проб воздуха	
Термостаты электрические суховоздушные или водяные	
Автоклав электрический	ГОСТ 9586—75
Бокс, оборудованный бактерицидными лампами	
Холодильник бытовой	
Весы лабораторные, аналитические типа ВЛА-200	
Микроскоп биологический с иммерсионной системой типа «Биолам» Л-211	
Лупа с увеличением × 10	ГОСТ 25706—83
Чашки Петри бактериологические плоскодонные, стеклянные, диаметром 90 мм	ГОСТ 23932—90
Пробирки бактериологические П1 и П2 вместимостью 15 и 20 мл	ГОСТ 25336—82
Пипетки мерные на 1, 5 и 10 мл	ГОСТ 10515—75
Пипетки мерные на 1, 5, и 10 мл	ГОСТ 1770—74
Колбы конические вместимостью 250 и 500 мл	ГОСТ 1770—74
Секундомер	ГОСТ 9586—75
Барометр	ГОСТ 24696—79
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556—81

5.2. Реактивы, растворы

LB-агар (дрожжевой экстракт 5 г/л, триптон 10 г/л, NaCl 5 г/л, агар 15 г/л, режим стерилизации 1,1—1,2 ати в течение 30 мин)

Желточный агар (пептон – 20 г, Na_2HPO_4 – 2,5 г, NaCl – 1 г, $MgSO_4$ 0,5 % раствор – 1 мл, глюкоза – 1 г, агар – 12.5 г, дистиллированная вода – 500 мл, 1 куриный желток)

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Спирт этиловый ректификат	ГОСТ 5962—67
Циклогексемид *син.* актидион	

6. Требования безопасности

При выполнении измерений концентрации клеток штамма-продуцента в воздухе рабочей зоны соблюдают следующие требования.

6.1. Санитарные правила СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

6.2. Правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.005—88.

6.3. Электробезопасность при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019—79 и инструкции по эксплуатации прибора.

6.4. Руководство «Положение об организации работы по технике безопасности в микробиологической промышленности» (1980), «Инструкции по устройству, требованиям безопасности и личной гигиены при работе в микробиологических лабораториях предприятий микробиологической промышленности» (1977).

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

7. Требования к квалификации операторов

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

8. Условия измерений

Процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят в нормальных условиях при температуре воздуха (20 ± 5) °С, атмосферном давлении 740—760 мм рт. ст. и влажности воздуха не более 70 %.

9. Проведение измерения

9.1. Условия отбора проб воздуха

Для определения концентрации клеток микроорганизма воздух аспирируют при помощи пробоотборника со скоростью 100 л/мин на поверхность плотной питательной среды. Время аспирации воздуха (1—5 мин) зависит от предполагаемой концентрации клеток штамма.

Аппарат перед каждым отбором пробы воздуха тщательно протирают 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. 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.

9.2. Выполнение анализа

Метод предполагает учет количества типичных колоний, выросших на 2—3-и сутки после посева проб воздуха по культурально-морфологическим признакам. Прямой метод позволяет учитывать на чашке до 200 колоний продуцента.

LD-агар расплавляют, остужают до 50—60 °С, добавляют циклогекксемид, из расчета 0,5 г на 1 л среды (для подавления посторонней бактериальной микрофлоры и микромицетов), тщательно перемешивают и разливают по 10 мл в стеклянные чашки Петри на горизонтальной поверхности.

Чашки с застывшей средой помещают в термостат на сутки при температуре 37 °С, после чего проросшие чашки бракуют, стерильные чашки используют для контроля воздуха.

После отбора проб воздуха чашки Петри помещают в термостат при температуре 29—30 °С. Через 2—3 суток производят подсчет выросших типичных по морфологическим признакам колоний продуцента. При необходимости культуру подвергают микроскопированию.

Дополнительным функциональным методом является отбор пробы воздуха на чашки Петри с желточным агаром.

Для приготовления желточного агара смешивают указанные выше компоненты, смесь кипятят до растворения агара, стерилизуют автоклавированием при 0,5 атм и охлаждают до 60 °С. Скорлупу яйца дезинфицируют спиртом. Яйцо разбивают, отделяют желток от белка и переносят с соблюдением правил асептики в расплавленный агар. Агар перемешивают до получения однородной суспензии, разливают по чашкам и оставляют по полного затвердевания.

После отбора проб воздуха чашки инкубируют в термостате при 29 °С в течение 48—72 ч и внимательно просматривают в косом освещении. Вокруг колоний штамма, продуцирующего липазу, образуются маслянистые, блестящие с переливами или перламутровые зоны.

Ростовые свойства всех используемых питательных сред должны быть проверены в соответствии с «Требованиями к ростовым свойствам питательных сред» (Государственная Фармакопея СССР, изд. XI, вып. 2, с. 208), что позволит более полно оценить пределы ошибки метода. Для этого эталонный музейный штамм-продуцент высевается на 2—3 чашки каждой используемой среды.

10. Вычисление результатов измерения

Расчет концентрации клеток продуцента в пересчете на 1 м^3 воздуха производят по формуле:

$$X = \frac{N \cdot 1\,000}{V}, \text{ кл./м}^3, \text{ где}$$

X – концентрация клеток продуцента в воздухе;
N – количество колоний продуцента, выросших на чашке;
1 000 – коэффициент пересчета на 1 м^3 воздуха;
V – объем воздуха, л (произведение скорости на время аспирации).

11. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по форме:

Протокол №
количественного микробиологического анализа штамма-продуцента *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3323 в воздухе рабочей зоны

1. Наименование и адрес испытательной лаборатории (центра), проводящей измерения, аттестат аккредитации лаборатории.
2. Юридический и фактический адрес организации-заказчика.
3. Идентификация используемого метода, методики, ссылки на методы, используемые испытательной лабораторией.
4. Описание состояния объекта исследования.
5. Дата получения объекта измерений и дата проведения анализа.
6. Место отбора пробы.

Результаты микробиологического анализа

Шифр или № пробы	Определяемый микроорганизм	Концентрация, кл./м^3

Ответственный исполнитель:
Руководитель:

Список литературы

1. ГОСТ 12.1.005—88 «ССБТ. Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования».
2. ГОСТ 8.563—96 ГСИ «Методики выполнения измерений».
3. Положение об организации работы по технике безопасности в микробиологической промышленности. М., 1980. 27 с.
4. Инструкции по устройству, требованиям безопасности и личной гигиены при работе в микробиологических лабораториях предприятий микробиологической промышленности. М., 1977. 7 с.

gost.e-ecolog.ru