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

Содержание

Метод микробиологического измерения концентрации клеток дрожжевого гриба *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3323 – продуцента липазы в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.2715—10 4

Метод микробиологического измерения концентрации клеток дрожжевого гриба *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3323 – продуцента липазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.2725—10 11

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

Методические указания МУК 4.2.2715—10

1. Общие положения и область применения

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

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями ГОСТ 17.2.4.02—81 «Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ» 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 *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 атмосферном воздухе населенных мест – 50 кл./м^3, пометка А.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнения измерений количества клеток дрожжевого гриба в атмосферном воздухе населенных мест 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 подсчета 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 MAS-100 ECO фирмы «Merk» (Германия) для отбора проб воздуха	
Прибор для бактериологического анализа воздуха, модель 818 (щелевой прибор Кротова)	ТУ 64-12791—77
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 246 96—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. «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 картофельно-глюкозной среды. Время аспирации воздуха (5—15 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 дезин-

фицируют 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 липазы *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3323 в атмосферном воздухе населенных мест

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. Руководство по контролю загрязнения атмосферы РД 52.04.186 —96. М., 1991. 693 с.

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.

5. ГОСТ 17.2.4.02—81 «Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ».

gost.e-ecolog.ru