

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Метод микробиологического измерения  
концентрации *Komagataella (Pichia) pastoris*  
БРЦ ВКПМ У-4394 в атмосферном воздухе  
городских и сельских поселений**

Методические указания  
МУК 4.2.3566—19

Издание официальное

**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 У-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 У-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. Шенна).
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

Тираж 100 экз.

Печ. л. 0,5  
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 У-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 У-4394 в атмосферном воздухе городских и сельских поселений в диапазоне концентраций от 5 до 5000 клеток в 1 м<sup>3</sup> 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 У-4394 и его гигиенический норматив в атмосферном воздухе городских и сельских поселений**

2.1. Штамм *Komagataella (Pichia) pastoris* БРЦ ВКПМ У-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 У-4394.

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

Предельно допустимая концентрация (ПДК) *Komagataella (Pichia) pastoris* в атмосферном воздухе установлена в гигиенических нормативах<sup>2</sup>.

### **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<sup>3</sup> 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.

---

<sup>1</sup> СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

<sup>2</sup> 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 $\pm 2,5$ мм рт. ст.	ТУ 2504-1799
Весы лабораторные, аналитические, наибольший предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности $\pm 0,2$ 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 <sup>3</sup>	ГОСТ 29227
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25 и 50 см <sup>3</sup>	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 $(160 \pm 5)$ °С	ТУ 9452-010-00141798
Термостаты, позволяющие поддерживать рабочую температуру $(28 \pm 2)$ °С и $(37 \pm 2)$ °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
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<sup>3</sup>. 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, 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.

<sup>3</sup> 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 ( $20 \pm 5$ ) °С;
- атмосферное давление  $760 \pm 20$  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<sup>3</sup>): пептон – 10,0 г, глюкоза – 10,0 г, дрожжевой экстракт – 10,0 г, агар-агар – 15,0 г, дистиллированная вода – 1 000 см<sup>3</sup>.

Сухие компоненты растворяют в 1 000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, тщательно перемешивают и нагревают до полного растворения агара.

Приготовленную среду разливают в стерильные колбы по 250—500 см<sup>3</sup> 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<sup>4</sup>. Для этого чашки с застывшей средой помещают в

<sup>4</sup> 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<sup>5</sup>. Для этого эталонный музейный штамм *Komagataella (Pichia) pastoris* БРЦ ВКПМ У-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<sup>3</sup>;

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

1000 – коэффициент пересчета на 1 м<sup>3</sup> 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 <sup>3</sup>	Соотношение с величиной ПДК

<sup>5</sup> МУК 4.2.2316—08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».