

В. А. Филонюк¹, Н. В. Дудчик², В. В. Шевляков²

СОВРЕМЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ РАЗРАБОТКИ АТТЕСТОВАННЫХ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ И МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,¹
 РУП «Научно-практический центр гигиены», г. Минск²

Впервые в мировой практике обоснована технология разработки аттестованных методик выполнения измерений (МВИ) концентраций промышленных штаммов микроорганизмов (м.о.) и содержащих их микробных препаратов (МП) в воздухе рабочей зоны, включающая разработку методов количественного определения содержания м.о. в воздушной среде и метрологические исследования на основе унифицированных методических подходов к определению операционных характеристик и валидности разработанных методов. С учетом современных требований новых стандартов ISO усовершенствована технология метрологических исследований количественного определения в воздухе м.о. на примере дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* Л153. Унифицированная технология разработки МВИ концентрации м.о. и МП в воздухе рабочей зоны позволяет рационализировать (по снижению объема работ и затрат) исследования по разработке аттестованных МВИ для новых нормированных м.о., использование которых обеспечивает эффективный динамический контроль содержания м.о. и МП в воздухе рабочей зоны на соответствие их ПДКврз и в случае необходимости своевременное принятие превентивных мер.

Ключевые слова: микроорганизмы-продуценты, микробные препараты, хлебопекарные дрожжевые грибы *Saccharomyces cerevisiae* Л153, методики выполнения измерения их концентраций в воздухе рабочей зоны, метрологические исследования.

V. A. Filanyuk, N. V. Dudchik, V. V. Shevlaykov

MODERN TECHNOLOGY OF CERTIFIED METHODS DEVELOPMENT FOR CONTENT OF ACTIVE STRAINS AND MICROBIAL PREPARATIONS CONTROL IN THE WORKING AREA AIR

For the first time in world practice, the technology for the development of certified measurement procedures of concentrations of industrial strains of microorganisms (MO) and microbial preparations (MP) containing them in the air of the working area has been substantiated, including the development of methods for quantitative determination of the content of MO in the air and metrological studies based on unified methodological approaches to determining the operational characteristics and validity of the developed methods. Taking into account the modern requirements of the new ISO standards, the technology of metrological studies of MO quantitative determination in the air was improved using the yeast fungi *Saccharomyces cerevisiae* L153. Unified technology for the development of measurement procedures of MO and MP concentration in the air of the working area makes it possible to rationalize (to reduce the amount of work and costs) research on the development of certified measurement procedures for new normalized MO, the use of which provides effective dynamic control of the MO content and MP in the air of the working area for compliance with their hygiene standards and, if necessary, timely adoption of preventive measures.

Key words: active strains, microbial preparations, baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* L153, measurement concentrations procedures in the air of the working area, metrological studies.

Быстро развивающиеся в мире и Республике Беларусь приоритетные направления промышленной и медицинской биотехнологии, относя-

щиеся к высокотехнологичным V и VI укладам экономики, основаны на использовании различных видов и родов штаммов и серотипов селективных

или мутантных (полученных методом генной инженерии) микроорганизмов в качестве пробиотиков, продуцентов белка (биомасса, кормовые добавки), химических продуктов (полисахариды, органические кислоты, спирты, биокатализ), биологически активных веществ (амилолитические, протеолитические, пектолитические, целлюлолитические и другие ферменты, гормоны, антибиотики, аминокислоты, витамины), лекарственных препаратов и диагностических систем, микробных препаратов для защиты и стимуляции роста сельскохозяйственных растений, очистки от загрязнений природных экосистем и др. [3].

Вместе с реальным положительным эффектом применения продуктов современной биотехнологии, при производстве и использовании микроорганизмов-продуцентов (далее – м.о.) и микробных препаратов на их основе (далее – МП) возможно загрязнение ими производственной среды, выделение в воздух рабочей зоны и атмосферы с вредным воздействием за счет их выраженных аллергических и иммунотоксических свойств на здоровье работников и населения [9]. Главным и наиболее эффективным направлением обеспечения безопасности производственной среды для работников является гигиеническая регламентация вредного микробного производственного фактора и с этих позиций актуальна разработка предельно допустимых концентраций в воздухе рабочей зоны (далее – ПДКврз) наиболее широко производимых и используемых штаммов м.о. и МП [9].

К настоящему времени разработана современная методология гигиенического регламентирования и нормирования в воздухе рабочей зоны, установлены ПДКврз 105 м.о. и 26 МП [7, 9]. Соблюдение разработанных гигиенических нормативов м.о. и МП на их основе возможно только при производственном объективном динамическом контроле с использованием аттестованными микробиологическими лабораториями валидированных методик выполнения измерения концентраций в воздухе рабочей зоны промышленных штаммов микроорганизмов как отдельных, так и в составе микробных препаратов (далее – МВИ).

Однако в мировой практике отсутствуют единые в соответствии с требованиями международной организации по стандартизации (стандарты ИСО) унифицированные подходы по метрологическим исследованиям и аттестации МВИ с определением операционных характеристик и валидности предварительно разрабатываемых количественных методов определения содержания м.о. в воздушной среде. Методические приемы и алгоритмы расчета операционных характеристик методов определения микроорганизмов существуют только для воды, пищевых продуктов и кормов для животных [5, 6].

Следовательно, для обеспечения соблюдения требований санитарного и метрологического законодательства и технических нормативных правовых актов Республики Беларусь в области безопасного обращения м.о. и МП на их основе актуальны и необходимы современные методические подходы по их контролю в воздухе рабочей зоны на соответствие ПДКврз на основе обоснования технологии разработки стандартизованных и валидированных МВИ концентраций м.о. в воздушной среде.

Цель работы – обосновать современную технологию разработки аттестованных методик выполнения измерения концентраций промышленных штаммов микроорганизмов в воздухе рабочей зоны.

Материалы и методы

Первым этапом технологии разработки МВИ являлось обоснование единых принципов и подходов разработки методов количественного определения содержания в воздухе м.о. и МП. Они были основаны на экспериментальном моделировании микробного аэрозоля, на известных этапах и приемах микробиологической практики: отбор проб воздуха аспирационным способом с учетом отобранного объема, культивирование в оптимальных для изучаемых м.о. условиях на подобранных селективных питательных средах, подсчет сформированных колоний с характерными морфологическими признаками, идентификация микроорганизмов и колоний, расчет их количества на чашках с перерасчетом на 1 м³ воздуха [7, 9].

На созданной модели распыления в затравочных камерах объемом 250 л установки ингаляционного моделирования жидких аэрозолей отработаны режимы создания диапазона концентраций м.о. в замкнутом объеме с использованием различных типов распылителей, при разных скоростях подачи на эжекторы и на распылители потока воздуха, экспозициях распыления МП. Оптимизированы параметры аспирационного способа отбора проб воздуха (время и объем) при разных уровнях микробной нагрузки, проведена оптимизация состава питательных сред и режимов культивирования для каждого штамма м.о. с их последующей идентификацией. Полученный массив экспериментальных данных позволил выявить характер и закономерности роста м.о. в зависимости от концентрации в фиксированном объеме затравочной камеры. Установленные прямые зависимости между количеством выросших колоний на чашке и отобранном объемом воздуха в основном носили линейный характер, описывались регрессионными уравнениями с коэффициентами детерминации R^2 в диапазоне 0,93–0,96, что свидетельствует о высокой достоверности полученных

результатов количественного определения концентраций м.о. в воздухе [9].

Применение обоснованных методических подходов и принципов позволило определить в модельных экспериментах необходимые условия и требования по отбору проб воздуха на микробную обсемененность, установить прямые концентрационные зависимости, высокую достоверность и чувствительность количественного определения концентраций в воздухе аэрозолей как изолированных штаммов м.о. (хлебопекарные дрожжевые грибы штамма *Saccharomyces cerevisiae* Л153 (далее – *S. cerevisiae* Л153), так и ряда монокомпонентных и комбинированных МП по содержащимся в их составе м.о., на основании чего разработаны и утверждены инструментальные методы их количественного определения в воздухе рабочей зоны [9].

На последующем этапе для разработки МВИ требовалось проведение метрологических исследований по определению категорийных характеристик разработанных методов определения м.о. в воздухе, связанных с их специфичностью и селективностью.

Результаты и обсуждение

Разработка аттестованных и валидированных МВИ концентраций микробного аэрозоля в воздухе рабочей зоны является достаточно сложной аналитической задачей, поскольку стандартизованные методические подходы к метрологической оценке методов определения в воздухе м.о. отсутствовали.

В связи с этим на последующем этапе исследований требовалось определить категориальные характеристики разработанных методов определения м.о. в воздухе. Для этого, используя общие принципы и требования метрологической оценки МВИ содержания микроорганизмов в воде, пищевых продуктах и кормах для животных (формулы расчета операционных характеристик) [4–6], впервые разработаны технология метрологической оценки категориальных характеристик и валидности методов определения м.о. и МП в воздухе и алгоритм разработки аттестованной МВИ концентраций м.о. в воздухе рабочей зоны, наиболее подробно изложенные в инструкции по применению № 009-1015 [7].

Первоначальная технология метрологической оценки разработанных методов определения содержания клеток штаммов м.о. в воздухе и аттестации МВИ осуществлялась в соответствии с СТБ ИСО 5725 (ч. 2, 3, 6) [8] и была основана на анализе статистических данных результатов 20 серий измерений образцов проб воздуха рабочей зоны производства м.о. или МП с двукратным подсчетом двумя операторами на параллельных чашках общего количества колоний, характерных по культурально-морфологическим признакам для каждого штамма м.о., путем

оценки прецизионности методики и неопределенности подсчета с определением показателей взвешенного совокупного относительного стандартного отклонения, стандартного отклонения и значения предела повторяемости, стандартного отклонения промежуточной прецизионности (внутрилабораторной воспроизводимости); расширенной неопределенности измерения данной методикой при выполнении в условиях лаборатории; оценки пропорциональности (линейности) методики, ее специфичности и селективности по показателям чувствительности, специфичности, частоте ложноположительных и ложноотрицательных результатов; эффективности, селективности и верхнему пределу линейности. Определение чувствительности, селективности метода, определения частоты ложноположительных и ложноотрицательных результатов проводилось для каждого штамма м.о., входящего в состав соответствующего МП [9].

На основании разработанной технологии метрологических исследований впервые были разработаны и аттестованы РУП «Белорусский государственный институт метрологии» МВИ в воздухе рабочей зоны концентраций клеток м.о., входящих в состав МП «Бетапротектин», «Стимул», «Профибакт™-Фито».

В последующем технология метрологических исследований была нами усовершенствована по принципиальным позициям с учетом требований новых стандартов ISO [2, 10], обусловленных специфическими микробиологическими параметрами исследуемых образцов воздуха, т. к. распределение м.о. в воздухе рабочей зоны является относительно однородным.

В качестве примера приводим результаты метрологической оценки разработанной методики выполнения измерений концентраций клеток штамма *S. cerevisiae* Л153 в воздухе рабочей зоны, выполненной в соответствии с усовершенствованной технологией оценки категориальных характеристик. Она предусматривает моделирование 3 уровней контаминации воздуха клетками м.о. с учетом значения установленной ПДК_{врз} в диапазоне 15–50, 51–200, 201–2000 КОЕ/м³, расчет операционных характеристик для каждого уровня измерений: показатели прецизионности (S_r , $S_{I(O)}$, r , $r_{I(O)}$), неопределенности подсчета, пропорциональности (линейность), чувствительность, селективность, частота ложноположительных и ложноотрицательных значений, эффективность, с последующей агрегацией результатов как максимально полученных в целом для методики.

Оценка показателей прецизионности методики и неопределенности подсчета. Оценка взвешенного совокупного относительного стандартного отклонения (неопределенность подсчета по терминологии ISO 13843:2017 производилась в соответствии с п. А.1

данного стандарта [2]). Показатели прецизионности (повторяемость и промежуточная прецизионность с изменяющимся фактором «оператор») определялись в соответствии с СТБ ИСО 5725-(1-6)-2002 [8]. Для оценки прецизионности использовали результаты статистического анализа данных микробной

обсемененности проб воздуха рабочей зоны биотехнологического производства *S. cerevisiae* Л153. Проведено $p = 15$ измерений ($n = 2$), выполненных с двумя изменяющимися факторами: время и оператор, рассчитаны значения оценок стандартного отклонения повторяемости (таблица 1).

Таблица 1. Сопоставление исходных данных, абсолютные разности, квадраты разностей, проверка по критерию Кохрена на выбросы, расчет повторяемости

i	x_{ia}	x_{ib}	$y_{ia} = \log_{10}(x_{ia})$	$y_{ib} = \log_{10}(x_{ib})$	$ y_{ia} - y_{ib} $	$ y_{ia} - y_{ib} ^2$	C_r
Уровень 1: 15–50 КОЕ/м ³							
1	20	23	1,30	1,36	0,0607	0,0037	0,189
2	17	24	1,23	1,38	0,1498	0,0224	
3	30	19	1,48	1,28	0,1984	0,0393	
4	25	19	1,40	1,28	0,1192	0,0142	
5	34	29	1,53	1,46	0,0691	0,0048	
6	19	19	1,28	1,28	0,0000	0,0000	
7	28	43	1,45	1,63	0,1863	0,0347	
8	49	33	1,69	1,52	0,1717	0,0295	
9	26	30	1,41	1,48	0,0621	0,0039	
10	29	30	1,46	1,48	0,0147	0,0002	
11	34	26	1,53	1,41	0,1165	0,0136	
12	42	44	1,62	1,64	0,0202	0,0004	
13	15	24	1,18	1,38	0,2041	0,0417	
14	41	40	1,61	1,60	0,0107	0,0001	
15	33	35	1,52	1,54	0,0256	0,0007	
Уровень 2: 51–200 КОЕ/м ³							
1	101	130	2,00	2,11	0,110	0,012	0,252
2	150	153	2,18	2,18	0,0086	0,0001	
3	160	129	2,20	2,11	0,0935	0,0087	
4	190	170	2,28	2,23	0,0483	0,0023	
5	155	171	2,19	2,23	0,0427	0,0018	
6	162	119	2,21	2,08	0,1340	0,0179	
7	156	140	2,19	2,15	0,0470	0,0022	
8	150	151	2,18	2,18	0,0029	0,0000	
9	156	165	2,19	2,22	0,0244	0,0006	
10	133	131	2,12	2,12	0,0066	0,0000	
11	120	120	2,08	2,08	0,0000	0,0000	
12	134	141	2,13	2,15	0,0221	0,0005	
13	155	161	2,19	2,21	0,0165	0,0003	
14	140	143	2,15	2,16	0,0092	0,0001	
15	152	164	2,18	2,21	0,0330	0,0011	
Уровень 3: 201–2000 КОЕ/м ³							
1	462	460	2,67	2,66	0,00188	0,000004	0,205
2	433	430	2,64	2,63	0,00302	0,00001	
3	463	459	2,67	2,66	0,00377	0,00001	
4	482	483	2,68	2,68	0,00090	0,00000	
5	484	490	2,69	2,69	0,00535	0,00003	
6	481	495	2,68	2,70	0,0125	0,00016	
7	493	495	2,69	2,70	0,00176	0,00000	
8	521	520	2,72	2,72	0,00083	0,00000	
9	541	530	2,73	2,72	0,00892	0,00008	
10	460	500	2,66	2,70	0,0362	0,00131	
11	480	490	2,68	2,70	0,00895	0,00008	
12	565	530	2,75	2,72	0,0278	0,00077	
13	510	540	2,71	2,73	0,0248	0,00062	
14	440	500	2,64	2,70	0,0555	0,00308	
15	550	570	2,74	2,76	0,0155	0,00024	

Проверку дисперсий на однородность выполняли по критерию Кохрена. Тест-статистику Кохрена C_r рассчитывали по формуле:

$$C_r = \frac{\text{MAX}[(y_{i1} - y_{i2})^2]}{\sum_{i=1}^p (y_{i1} - y_{i2})^2}, \quad (1)$$

где i – индекс серии измерений, $i = 1, \dots, p$, ($p = 15$); y_{i1} , y_{i2} – результат измерений, преобразованный в \log_{10} КОЕ/м³ по формуле:

$$y_{i1} = \log_{10} x_{i11}; y_{i2} = \log_{10} x_{i12}. \quad (2)$$

Рассчитанное значение тест-статистики сравнивали с критическим значением Кохрена C_r ($v = 2$; $f = 15$; $P = 95\%$) = 0,471. Так как выполняется условие $C_r < C_{cr}$ ($v = 2$; $f = 15$; $P = 95\%$), то статистические разбросы и выбросы отсутствуют. Расчет стандартного отклонения повторяемости проводили по формуле:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (y_{i1} - y_{i2})^2}{2 \times p}}. \quad (3)$$

Стандартное отклонение повторяемости, рассчитанное согласно формуле (3), составляет $S_r = 0,530 \log_{10}$ КОЕ/м³.

Расчет стандартного отклонения $\delta_{I(O)}$ промежуточной прецизионности проводили по формуле:

$$S_{I(O)} = \sqrt{\frac{1}{2} \left(\sum_{i=1}^{15} \frac{(y_{i1} - y_{i2})^2}{n-1} \right) + \left(\sum_{i=1}^{15} \frac{(\bar{y}_b - y_{bi})^2}{n-1} \right)}, \quad (4)$$

где Y_n – результат измерений, преобразованный в \log_{10} КОЕ/м³; i – индекс образца, $i = \dots, n$ ($n = 15$); a, b – индекс фактора оператора, А или В.

Средние значения \bar{y}_a и \bar{y}_b рассчитывали по формулам:

$$\bar{y}_a = \sum_{i=1}^{15} y_a / n \text{ и } \bar{y}_b = \sum_{i=1}^{15} y_b / n, \quad (5)$$

где Y_n – результат измерений, преобразованный в \log_{10} КОЕ/м³; i – индекс образца, $i = \dots, n$ ($n = 15$); a, b – индекс фактора оператора, А или В.

Рассчитанные значения оценок стандартного отклонения промежуточной прецизионности приведены в таблице 2.

Таблица 2. Сопоставление исходных данных, расчет промежуточной прецизионности

i	x_{ia}	x_{ib}	$y_{ia} = \log_{10}(x_{ia})$	$y_{ib} = \log_{10}(x_{ib})$	$(y_{ia} - y_{1cp})$	$(y_{ib} - y_{2cp})$	$(y_{ia} - y_{1cp})^2$	$(y_{ib} - y_{2cp})^2$
Уровень 1: 15–50 КОЕ/м ³								
1	20	23	1,30	1,36	0,145	0,087	0,0211	0,0076
2	17	24	1,23	1,38	0,216	0,069	0,0466	0,0047
3	30	19	1,48	1,28	0,031	0,170	0,0010	0,0289
4	25	19	1,40	1,28	0,048	0,170	0,0023	0,0289
5	34	29	1,53	1,46	0,085	0,014	0,0073	0,0002
6	19	19	1,28	1,28	0,167	0,170	0,0281	0,0289
7	28	43	1,45	1,63	0,001	0,185	0,0000	0,0341
8	49	33	1,69	1,52	0,244	0,070	0,0595	0,0049
9	26	30	1,41	1,48	0,031	0,028	0,0010	0,0008
10	29	30	1,46	1,48	0,016	0,028	0,0003	0,0008
11	34	26	1,53	1,41	0,085	0,034	0,0073	0,0011
12	42	44	1,62	1,64	0,177	0,195	0,0313	0,0379
13	15	24	1,18	1,38	0,270	0,069	0,0730	0,0047
14	41	40	1,61	1,60	0,167	0,153	0,0277	0,0235
15	33	35	1,52	1,54	0,072	0,095	0,0052	0,0091
			$y_{1cp} = 1,456$	$y_{2cp} = 1,449$				
Уровень 2: 51–200 КОЕ/м ³								
2	101	130	2,00	2,11	0,161	0,047	0,0258	0,00221
3	150	153	2,18	2,18	0,011	0,024	0,000125	0,000566
4	160	129	2,20	2,11	0,039	0,050	0,00154	0,00253
5	190	170	2,28	2,23	0,114	0,070	0,0130	0,00484
6	155	171	2,19	2,23	0,025	0,072	0,000645	0,00520
7	162	119	2,21	2,08	0,045	0,085	0,00199	0,00729
8	156	140	2,19	2,15	0,028	0,015	0,000795	0,000218
9	150	151	2,18	2,18	0,011	0,018	0,000125	0,000327
10	156	165	2,19	2,22	0,028	0,057	0,000795	0,00320
11	133	131	2,12	2,12	0,041	0,044	0,00170	0,00190
12	120	120	2,08	2,08	0,086	0,082	0,00735	0,00668
13	134	141	2,13	2,15	0,038	0,012	0,00143	0,000136
14	155	161	2,19	2,21	0,025	0,046	0,000645	0,00211
15	140	143	2,15	2,16	0,019	0,006	0,000353	0,0000309
			$y_{1cp} = 2,165$	$y_{2cp} = 2,161$				

<i>i</i>	x_{ia}	x_{ib}	$y_{ia} = \log_{10}(x_{ia})$	$y_{ib} = \log_{10}(x_{ib})$	$(y_{ia}-y_{1cp})$	$(y_{ib}-y_{2cp})$	$(y_{ia}-y_{1cp})^2$	$(y_{ib}-y_{2cp})^2$
Уровень 3: 201–2000 КОЕ/м ³								
1	464	460	2,67	2,66	0,025	0,035	0,000633	0,00121
2	433	430	2,64	2,63	0,053	0,064	0,00284	0,00410
3	463	459	2,67	2,66	0,024	0,036	0,000587	0,00127
4	482	483	2,68	2,68	0,007	0,010	0,0000456	0,000183
5	484	490	2,69	2,69	0,005	0,007	0,0000246	0,0000532
6	481	495	2,68	2,70	0,008	0,003	0,0000587	0,0000083
7	493	495	2,69	2,70	0,003	0,003	0,0000093	0,0000083
8	521	520	2,72	2,72	0,027	0,019	0,000731	0,000343
9	541	530	2,73	2,72	0,043	0,027	0,00188	0,000718
10	460	500	2,66	2,70	0,027	0,001	0,000732	0,0000022
11	480	490	2,68	2,70	0,009	0,007	0,0000733	0,0000532
12	565	530	2,75	2,72	0,062	0,027	0,00387	0,000718
13	510	540	2,71	2,73	0,018	0,035	0,000316	0,00122
14	440	500	2,64	2,70	0,046	0,001	0,00215	0,0000022
15	550	570	2,74	2,76	0,051	0,058	0,00256	0,00341
			$y_{1cp} = 2,690$	$y_{2cp} = 2,697$				

Показатели прецизионности в виде стандартных отклонений устанавливаются для всего диапазона измерения МВИ как максимальное из полученных соответствующих оценок по трем уровням испытаний.

Значение предела повторяемости r , $\log_{10}(\text{КОЕ}/\text{м}^3)$, рассчитывали по формуле:

$$r = 2,8x\delta_r \quad (6)$$

Тогда $r = 2,8 \times 0,924 \log_{10} \text{КОЕ}/\text{м}^3 = 1,485 \log_{10} \text{КОЕ}/\text{м}^3$.

Значение предела промежуточной прецизионности $r_{l(0)}$, $\log_{10}(\text{КОЕ}/\text{м}^3)$, рассчитывали по формуле:

$$r_{l(0)} = 2,8\delta_{l(0)} \quad (7)$$

Установленные показатели прецизионности в виде стандартных отклонений и пределов приведены в таблице 3.

Оценку неопределенности измерения проводили по ISO 29201:2012 [10]. Расширенную неопределенность U с коэффициентом охвата 2 (прибли-

зительно соответствующим доверительному интервалу 95 %) рассчитывали по формуле

$$U = 2\delta_{l(0)}, \quad (8)$$

где $\delta_{l(0)}$ – стандартное отклонение промежуточной прецизионности, $\log_{10} \text{КОЕ}/\text{м}^3$. Расширенная неопределенность для данной методики при выполнении в условиях лаборатории, рассчитанная по формуле (8), составила $0,7372 \log_{10} \text{КОЕ}/\text{м}^3$.

В соответствии с ISO 29201:2012 полученная оценка расширенной неопределенности относится к единичному измерению и может быть использована как максимальная оценка неопределенности для результата измерения, получаемого в соответствии с аттестуемой МВИ.

Установленные значения показателей прецизионности (повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности) и максимальной расширенной неопределенности при уровне доверия $P = 0,95$ приведены в таблице 4.

Таблица 3. Значения показателей прецизионности и максимальной расширенной неопределенности при уровне доверия $P = 0,95$ для трех диапазонов измерения

Уровень испытания, $\log_{10}(\text{КОЕ}/\text{м}^3)$	Стандартное отклонение повторяемости δ_r , $\log_{10}(\text{КОЕ}/\text{м}^3)$	Стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\delta_{l(0)}$, $\log_{10}(\text{КОЕ}/\text{м}^3)$
1,458	0,084	0,14
2,163	0,040	0,060
2,694	0,021	0,033

Таблица 4. Значения показателей прецизионности (повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности) и максимальной расширенной неопределенности при уровне доверия $P = 0,95$ для методики выполнения измерений

Диапазон измерения величина $\text{КОЕ}/\text{м}^3$	Стандартное отклонение повторяемости δ_r , $\log_{10}(\text{КОЕ}/\text{м}^3)$	Предел повторяемости r , $\log_{10}(\text{КОЕ}/\text{м}^3)$	Стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\delta_{l(0)}$, $\log_{10}(\text{КОЕ}/\text{м}^3)$	Предел промежуточной прецизионности $r_{l(0)}$, $\log_{10}(\text{КОЕ}/\text{м}^3)$	Максимальная расширенная неопределенность U , $\log_{10}(\text{КОЕ}/\text{м}^3)$
15–2000	0,084	0,24	0,14	0,38	0,28

Оценка логарифмического отношения правдоподобия пропорциональности (линейности) определялась по формуле:

$$G_{n-1}^2 = 2 \left[c_1 \ln \frac{c_1}{R_1} + c_2 \ln \frac{c_2}{R_2} + \dots + c_n \ln \frac{c_n}{R_n} \right], \quad (9)$$

где c_1, c_2, \dots, c_n – количество колоний на чашках; R_1, R_2, R_n – объем проб воздуха. Значение G_5^2 , рассчитанное по формуле (9), составило 8,234.

Оценка пропорциональности (линейности) методики. Возможность методики при использовании с определенной матрицей показывать результаты, пропорциональные количеству анализируемых м.о. в исследуемом образце, определялась в соответствии с ISO 13843-2017 [2].

Данные для оценки пропорциональности (линейности) получены по результатам анализа образцов рабочих проб воздуха рабочей зоны. Проведено 6 определений, выполненных с тремя параллельными подсчетами ($n = 3$). При оценке пропорциональности (линейности) исключали результаты подсчета с низким числом колоний (уровень ниже чем 3 КОЕ/м³). Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Сопоставление исходных данных для оценки пропорциональности (линейности)

№ п/п	Объем воздуха, дм ³ R_i	Параллельные подсчеты (3 чашки)			Сумма колоний на чашках, C_i	Отношение C_i/R_i
1	20	9	12	8	29	1,45
2	30	23	24	20	67	2,23
3	40	31	34	39	104	2,60
4	60	77	65	62	202	3,37
5	80	74	72	69	215	2,69
6	160	90	84	83	257	1,61
	Итого: 390	Итого: 876				

Критерием пропорциональности (линейности) является сравнение полученного значения G_5^2 с теоретическим значением χ^2 распределения для $f = 5$ и $p = 0,1\%$, равным 20,515. Вычисленное значение не превышает значение χ^2 для пяти степеней свободы и $p = 0,1\%$, что свидетельствует о том, что методика дает результаты, пропорциональные количеству анализируемых микроорганизмов в исследуемом образце.

Оценка показателей специфичности и селективности методики. Показатели специфичности и селективности определялись в соответствии с ISO 13843:2017, разделы 8, 9 [2]. Показатели специфичности и селективности методики оценивали при подсчете колоний, типичных по морфо-культуральным признакам (колонии светло-бежевые, размером 4–5 мм, поверхность гладкая, матовая, консистенция пастообразная, форма круглая, края ровные, внутренний узор отсутствует, профиль конусообразный).

Эту категорию оценивали как предположительно положительные (ПП) на основании первой оцен-

ки. Колонии с морфо-культуральными признаками, отличными от описанных, оценивали как предвременно отрицательные (ПО).

Затем проводили изучение с использованием микроскопирования методом раздавленной капли. Морфологические признаки: клетки имеют удлиненную, овальную, эллипсоидную, или шаровидную форму. Размеры клеток варьируют от 2,5 до 10 микрон в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину. Колонии, вегетативные клетки которых отличались от описанных тинкториальных признаков, оценивали как истинно отрицательные результаты.

Изученные колонии подсчитывали и относили к следующим категориям: *a* – положительные колонии, которые содержат *S. cerevisiae* $\Lambda 153$; *b* – отрицательные колонии, которые содержат *S. cerevisiae* $\Lambda 153$; *c* – положительные колонии, которые не содержат *S. cerevisiae* $\Lambda 153$; *d* – отрицательные колонии, которые не содержат *S. cerevisiae* $\Lambda 153$.

На основании полученных результатов оценивали чувствительность, специфичность, частоту ложноположительных и ложноотрицательных результатов: чувствительность = $a/(a + b)$, доля общего количе-

ства положительных результатов, правильно определенных при предположительном подсчете; специфичность = $d/(c + d)$, доля общего количества отрицательных результатов, правильно определенных при предположительном подсчете; частота ложноположительных результатов = $c/(a + c)$, доля наблюдаемых положительных результатов, определенных ошибочно; частота ложноотрицательных результатов = $b/(b + d)$, доля наблюдаемых отрицательных результатов, определенных ошибочно; эффективность $E = (a + d)/n$, доля колоний, определенных правильно; селективность $F = \lg [(a + c)/n]$ – доля предполагаемых целевых колоний (предполагаемых положительных результатов) от общего количества колоний. Результаты представлены в таблице 6.

В таблице 7 представлены полученные в результате эксперимента и анализа метрологические характеристики, показатели специфичности и селективности разработанной методики.

Следовательно, разработанная МВИ обладает высокой специфичностью, чувствительностью и се-

Таблица 6. Сопоставление исходных данных для оценки показателей специфичности и селективности методики

Этапы	Положительные	Отрицательные	a	b	c	d	n
1 этап	21 (a + c)	2 (b + d)	21	0	0	2	23
2 этап	21(a + b)	2 (d)					
Чувствительность	1,000						
Специфичность	1,000						
Частота ложноположительных результатов	0,000						
Частота ложноотрицательных результатов	0,000						
Селективность	-0,039						
Эффективность	1						
Верхний предел линейности	Не более 150 колоний на чашку						

Таблица 7. Метрологические характеристики и показатели специфичности и селективности МВИ концентраций клеток *S. cerevisiae* Л153 в в.р.з.

Метрологическая характеристика, показатели специфичности и селективности	Полученная оценка
Взвешенное совокупное относительное стандартное отклонение подсчета, S_z	0,101
Стандартное отклонение повторяемости, S_r	0,530 \log_{10} (КОЕ/м ³)
Предел повторяемости, r	1,485 \log_{10} (КОЕ/м ³)
Стандартное отклонение промежуточной прецизионности, $S_{I(O)}$	0,3686 \log_{10} (КОЕ/м ³)
Предел промежуточной прецизионности, $r_{I(O)}$	1,0321 \log_{10} (КОЕ/м ³)
Расширенная неопределенность, U ($k = 2, P = 95 \%$)	0,7372 \log_{10} (КОЕ/м ³)
Чувствительность	1,000
Специфичность	1,000
Частота ложноположительных результатов	0,000
Частота ложноотрицательных результатов	0,000
Селективность	-0,039
Эффективность	1,000
Верхний предел линейности	до 150 колоний на чашку

ллективностью. На этом основании МВИ в воздухе рабочей зоны концентраций клеток дрожжевых грибов штамма *S. cerevisiae* Л153 аттестована республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (свидетельство № 1105/2018 от 21.05.2018 г.).

Апробация МВИ при гигиенической оценке микробного загрязнения воздуха рабочей зоны в производстве хлебопекарных дрожжей показало ее объективность и валидность [1].

Приведенная современная технология разработки валидированной МВИ концентраций м.о. в воздушной среде отвечает требованиям стандартов ИСО, определяет возможность использования МВИ аттестованными микробиологическими лабораториями центров гигиены и эпидемиологии и биотехнологических предприятий для производственного контроля содержания м.о. и МП на их основе в воздухе рабочей зоны на соответствие их гигиенических нормативов.

Из представленных результатов выполненных исследований вытекают следующие выводы:

1. Впервые предложена технология разработки аттестованных методик выполнения измерений концентраций промышленных штаммов микроорганизмов и содержащих их микробных препаратов в воз-

духе рабочей зоны, включающая этап разработки методов количественного определения м.о. в воздушной среде и этап метрологических исследований на основе унифицированных методических подходов к определению операционных характеристик (стандартное отклонение повторяемости S , предел повторяемости, стандартное отклонение и предел промежуточной прецизионности, расширенная неопределенность) и валидности (взвешенное совокупное относительное стандартное отклонение подсчета клеток, чувствительность, специфичность, частота ложноположительных и ложноотрицательных результатов, селективность, эффективность, верхний предел линейности) разработанных методов, которые формализованы в инструкции по применению № 009-1015 [7], что обеспечивает рационализацию (по снижению объема работ и затрат) и стандартизацию метрологических исследований по разработке аттестованных МВИ.

2. С учетом современных требований новых стандартов ISO усовершенствованы по принципиальным позициям методические подходы к метрологической аттестации методов количественного определения в воздухе м.о. на примере хлебопекарных дрожжей *S. cerevisiae* Л153, предусматривающие моделирование 3 уровней контаминации

воздуха м.о. в диапазоне от 15 до 2000 КОЕ/м³, включая значения 2 ПДК, расчет операционных характеристик для каждого уровня измерений и последующую агрегацию результатов как максимально полученных в целом, определение чувствительности, специфичности и эффективности МВИ.

3. Выполненные метрологические исследования позволили впервые разработать и аттестовать методики выполнения измерений в воздухе рабочей зоны концентраций клеток дрожжевых грибов штамма *Saccharomyces cerevisiae* Л153, клеток м.о., входящих в состав микробных препаратов «Бета-протектин», «Стимул», «ПрофибактTM-Фито», что определяет возможность объективно проводить производственный контроль содержания этих м.о. и МП в воздухе рабочей зоны на соответствие их ПДК_{врз} аттестованными микробиологическими лабораториями вне зависимости от их ведомственной подчиненности, обеспечивает своевременное принятие мер при нарушении допустимых уровней загрязнения м.о. воздуха производственной среды.

Литература

1. Гигиеническая оценка микробного загрязнения воздуха рабочей зоны в производстве хлебопекарных дрожжей / В. А. Филонюк [и др.] // Здоровье и окружающая среда: сб. материалов междунар. науч.-практ. конф., Минск, 15–16 нояб. 2018 г.: в 2 т. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Науч.-практ. центр гигиены; гл. ред. С. И. Сычик. – Минск: РНМБ, 2018. – Т. 1. – С. 127–130.

2. Качество воды. Требования к установлению характеристик выполнения количественных микробиологических методов: ISO 13843:2017. – Введ. 27.06.17. – Минск: БелГИСС, 2017. – 68 с.

3. Коломиец, Э. И., Ракецкая О. А. Состояние и перспективы развития биотехнологии в Республике Беларусь / Э. И. Коломиец, О. А. Ракецкая // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / НАН Беларуси [и др.]. – Минск, 2013. – Т. 5: посвящен 85-летию со дня основания Национальной академии наук Беларуси. – С. 3–9.

4. Методики выполнения измерений: ГОСТ Р 8.563-96 ГСИ. – Введ. 02.05.96. – М.: Госстандарт России, 2002. – 20 с.

5. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство по оценке неопределенности измерения для количественных определений: ISO/TS 19036:2006. – Введ. 01.02.06. – Минск: БелГИСС, 2006. – 36 с.

6. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования к выполнению микробиологических исследований: СТБ ISO 7218-2010. – Введ. 01.01.11. – Минск: БелГИСС, 2010. – 66 с.

7. Обоснование предельно допустимых концентраций и методик выполнения измерений содержания в воздухе рабочей зоны микроорганизмов-продуцентов и микробных препаратов на их основе: инструкция по применению № 009-1015 / В. А. Филонюк [и др.] / М-во здравоохранения Респ. Беларусь. – Минск, 2015. – 30 с.

8. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений : СТБ ИСО 5725-(1-6)-2002: в 6 ч. Ч. 2: Введ. 01.09.03. – Минск: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2003. – 68 с.

9. Филонюк, В. А. Методология гигиенического регламентирования микробных препаратов и разработки методик выполнения измерений содержания микроорганизмов в воздухе рабочей зоны / В. А. Филонюк, В. В. Шевляков, Н. В. Дудчик; М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ. унитар. предприятие «Науч.-практ. центр гигиены». – Минск: БелНИИТ «Транс-техника», 2018. – 264 с.

10. Water quality – The variability of test results and uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods: ISO 29201 : 2012(R2017) // International Organization for Standardization. – Published: 01-01-2012. – Mode of access: https://infostore.saiglobal.com/en-us/Standards/ISO-29201-2012-R2017-599671_SAIG_ISO_ISO_1373114/. – Date of access: 20.01.2018.

References

1. *Gigiyenicheskaya otsenka mikrobnogo zagryazneniya vozdukhа rabochey zony v proizvodstve khlebopekarnykh drozhzhey* / V. A. Filonyuk [i dr.] // Zdorov'ye i okruzhayushchaya sreda: sb. mater. mezhdunar. nauch.-prakt. konf., Minsk, 15–16 noyab. 2018 g.: v 2 t. / M-vo zdравookhr. Resp. Belarus', Nauch.-prakt. tsentr gigiyeny; gl. red. S. I. Sychik. – Minsk: RNMB, 2018. – T. 1. – S. 127–130.

2. *Kachestvo vody. Trebovaniya k ustanovleniyu kharakteristik vypolneniya kolichestvennykh mikrobiologicheskikh metodov: ISO 13843:2017. Vved. 27.06.17.* – Minsk: BelGISS, 2017. – 68 s.

3. *Kolomiyets, E. I. Raketskaya, O. A. Sostoyaniye i perspektivy razvitiya biotekhnologii v Respublike Belarus' / E. I. Kolomiyets, O. A. Raketskaya // Mikrobnyye biotekhnologii: fundamental'nyye i prikladnyye aspekty: sb. nauch. tr. / NAN Belarusi [i dr.].* – Minsk, 2013. – T. 5: posvyashchen 85-letiyu so dnya osnovaniya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. – S. 3–9.

4. *Metodiki vypolneniya izmereniy: GOST R 8.563-96 GSI.* – Vved. 02.05.96. – M.: Gosstandart Rossii, 2002. – 20 s.

5. *Mikrobiologiya pishchevykh produktov i kormov dlya zhivotnykh. Rukovodstvo po otsenke neopredelennosti izmereniya dlya kolichestvennykh opredeleniy: ISO/TS 19036:2006.* – Vved. 01.02.2006. – Minsk: BelGISS, 2006. – 36 s.

6. *Mikrobiologiya pishchevykh produktov i kormov dlya zhivotnykh. Obshchiye trebovaniya k vypolneniyu mikrobiologicheskikh issledovaniy: STB ISO 7218-2010.* – Vved. 01.01.11. – Minsk: BelGISS, 2010. – 66 s.

7. *Obosnovaniye predel'no dopustimyykh kontsentratsiy i metodik vypolneniya izmereniy soderzhaniya v vozdukhе rabochey zony mikroorganizmov-produktentov i mikrobnykh preparatov na ikh osnove: instruksiya po primeneniyu № 009-1015 / V. A. Filonyuk [et al.] / M-vo zdравookhraniya Resp. Belarus'.* – Minsk, 2015. – 30 s.

8. *Tochnost' (pravil'nost' i pretsizionnost') metodov i rezul'tatov izmereniy: STB ISO 5725-(1-6)-2002: v 6 ch.* – Vved. 01.09.03. – Minsk: Mezghos. sovet po standartizatsii, metrologii i sertifikatsii, 2003. – 68 s.

9. *Filonyuk, V. A. Metodologiya gigiyenicheskogo reglamentirovaniya mikrobnykh preparatov i razrabotki metodik vypolneniya izmereniy soderzhaniya mikroorganizmov v vozdukhе rabochey zony / V. A. Filonyuk, V. V. Shevlyakov, N. V. Dudchik; M-vo zdравookhr. Resp. Belarus', Resp. unitar. predpriyatiye «Nauch.-prakt. tsentr gigiyeny».* – Minsk: BelNIIT «Transtekhnika», 2018. – 264 s.

10. Water quality – The variability of test results and uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods: ISO 29201: 2012(R2017) / International Organization for Standardization. – Published: 01-01-2012. – Mode of access: https://infostore.saiglobal.com/en-us/Standards/ISO-29201-2012-R2017-599671_SAIG_ISO_ISO_1373114/. – Date of access: 20.01.2018.

Поступила 08.02.2021 г.