Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3526—18

Издание официальное

Москва • 2018

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 *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3526—18

ББК 51.24
М54

М54 Метод микробиологического измерения концентрации *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 в воздухе рабочей зоны: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.—10 с.

ISBN 978–5–7508–1671–2

1. Разработаны и подготовлены ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Н. И. Шеина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 24 ноября 2017 г. № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 1 февраля 2018 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.24

ISBN 978–5–7508–1671–2

© Роспотребнадзор, 2018

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
1 февраля 2018 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3526—18

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода микробиологического количественного анализа концентрации *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 до 500 000 клеток в 1 $м^3$ воздуха.

1.2. Методические указания носят рекомендательный характер.

2. Биологическая характеристика штамма *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 и его гигиенический норматив в воздухе рабочей зоны

Штамм *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 выделен с поверхности листьев сои в Новосибирской области в 2010 г.

На основе штамма энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 создан инсектицид «Биослип БТ, П», который обладает широким спектром действия в отношении насекомых-вредителей сельского хозяйства, относящихся к отрядам Чешуекрылые и Двукрылые. Он активен в отношении личинок бабочек из семейства Белянки, Совки, Настоящие моли, Выемчатокрылые моли, Огневки, Плодожорки, а также в отношении насекомых из отряда Двукрылые: журчалок, галлиц, серебрянок.

Действующей основой препарата являются кристаллы белкового δ-эндотоксина и жизнеспособные споры штамма *B. thuringiensis ssp. toumanoffi* 25. Содержание жизнеспособных спор в инсектициде «Биослип БТ, П» составляет не менее 1×10^{10} КОЕ/г, количество кристаллов токсина равно общему количеству спор в препарате. В качестве вспомогательных веществ инсектицид содержит остатки защитной среды для сублимационной сушки – неорганические фосфаты, сухое молоко, желатин. Инсектицид представляет собой водорастворимый порошок.

Кристаллы токсина действуют в кишечнике насекомого при поедании, белковый токсин растворяется в кишечном соке насекомого при pH 9,5—10,5 и переходит в активную форму под действием протеолитических ферментов кишечного сока. В активном состоянии токсины формируют поры в клетках эпителия кишечника, что в дальнейшем приводит к гибели насекомого.

После попадания в кишечник насекомого гибель наступает в промежутке от 6 до 48 часов, в зависимости от вида насекомого, стадии его развития, количества попавшего в кишечник δ-эндотоксина.

Белковый δ-эндотоксин конденсируется в кристаллы ромбовидной формы (параспоральные тельца) и экскретируется на завершающей стадии спорообразования. Кристаллический δ-эндотоксин обладает высокой термостабильностью.

Штамм *B. thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 представляет собой грамположительные, подвижные, образующие жгутики палочки размером 0,7—1,2 ×2,5—4,0 мкм. Через 48 часов роста на МПА образуют овальные споры размером 0,6—0,8 × 1,2—2,0 мкм. Одновременно со спорой образуются параспоральные тельца ромбовидной формы разных размеров. На среде АГВ и картофельно-глюкозном агаре образуют серые полупрозрачные колонии с ровным краем. Оптимальная температура роста +28—31 °С.

Систематическое положение микроорганизма

Царство	*Procaryota*
Класс	*Schizomycetes*
Отряд	*Eubacteriales*
Семейство	*Bacillaceae*
Род	*Bacillus*
Вид	*thuringiensis*
Штамм	*ssp. toumanoffi* 25



Рис. 2. Внешний вид *Bacillus thuringiensis sp.*

Штамм образует ацетилметилкарбинол, на желтковой среде лецито-вителлиновая реакция положительная, образует кислоту из маннозы, не образует кислоту при росте на салицине и сахарозе, не гидролизует эскулин, образует уреазу на среде с мочевиной, гидролизует крахмал, пептонизирует молоко, ДНКазная активность отсутствует, ингибирует рост *Micrococcus lysodeikticus*.

Штамм *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 по критериям вирулентности, токсичности, токсигенности и диссеминации относится к непатогенным для теплокровных животных микроорганизмов. Он не является фитопатогенным, а также не входит в состав 4 групп патогенности в соответствии с СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами» в редакции Дополнений и изменений № 2, утвержденных Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.06.2011 № 86.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воздухе рабочей зоны – 50 000 кл./м^3.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнения измерений количества клеток в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 до 500 000 клеток в 1 м^3 воздуха при доверительной вероятности 0,95.

4. Методы измерений

Прямой метод основан на аспирации из воздуха рабочей зоны бактерий на мясо-пептонный агар (МПА) и подсчета количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам.

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

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

5.1. Средства измерений

Барометр-анероид с диапазоном измерения атмосферного давления 5—790 мм рт. ст. и пределом допустимой погрешности ± 2,5 мм рт. ст.	ТУ 2504-1799—75
Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности ± 0,2 мг	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные 2-100-2, 2-250-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770—74
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0, 2,0, 5,0, 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91
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—88
Аспирационный аппарат и устройство для отбора проб воздуха	

Примечание. Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

5.2. Вспомогательные устройства и материалы

Шкаф сушильный стерилизационный, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 9452-010-00141798—02
Термостаты, позволяющие поддерживать рабочую температуру (30 ± 2) °С и (37 ± 2) °С	ТУ 9452-002-00141798—97
Автоклав электрический	ГОСТ 9586—75
Стерилизаторы паровые медицинские	ГОСТ Р ЕН 13060—11 ГОСТ Р 51935—02
Дистиллятор	ТУ 4952-007-33142130—2000
Облучатель бактерицидный настенный	ТУ 9444-015-03965956—08
Холодильник бытовой	ГОСТ 26678—85
Микроскоп биологический с иммерсионной системой	

Лупа с увеличением ×10	ГОСТ 25706—83
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932—90
Чашки биологические (Петри) или одноразовые из полимерных материалов	ГОСТ 23932—90
Воронки конусные диаметром 40—45 мм	ГОСТ 25336—82
Груша резиновая	ТУ 9398-005-0576-908
Петля бактериологическая	
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556—81
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76

Примечание. Допускается применение оборудования и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

5.3. Реактивы и питательные среды

Агар микробиологический	ГОСТ 17206—96
Мясо-пептонный бульон (МПБ)	ГОСТ 20730—75
Спирт этиловый технический	ГОСТ 17299—78
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ Р 51652—2000 или ГОСТ 18300—87

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

6. Требования безопасности

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

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

6.2. СП 1.3.2518—09 Дополнения и изменения № 1 к СП 1.3.2322—08.

6.3. Правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007—76.

6.4. Требования по электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019—09 и инструкции по эксплуатации прибора.

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 допускаются лица с высшим или средним специальным образованием, прошедшие соответствующую подготовку и имеющие навыки работы в области микробиологических исследований.

8. Условия измерений

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 %.

9. Приготовление питательных сред

Для приготовления мясо-пептонного агара (МПА) к 1 000 $см^3$ мясо-пептонного бульона (МПБ) добавляют 15,0 г агар-агара, 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.

Готовые среды хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8 °С в течение 14 дней, не более.

10. Проведение измерения

10.1. Отбор проб воздуха

Отбор проб воздуха проводят с учетом требований ГОСТ 12.1.005—88 с изменением № 1 «ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны» и ГОСТ 8.563—96 «ГСИ. Методики выполнения измерений».

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.

10.2. Выполнение анализа

При выполнении анализа воздуха МПА расплавляют, остужают до 50—60 °С и разливают в чашки Петри.

Контроль чистоты розлива проводят в соответствии с п. 7.1.1. МУК 4.2.2316—08. Для этого чашки с застывшей средой помещают в 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 (30 ± 2) °С. Через 1—2 суток производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам.

Ростовые свойства используемой питательной среды должны быть проверены до проведения анализа воздуха в соответствии с требованиями к ростовым свойствам питательных сред, руководствуясь МУК 4.2.2316—08. Для этого эталонный музейный штамм *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 высевается на 2—3 чашки используемой среды.

Лиофилизованную культуру музейного штамма необходимо использовать 2—3 пассажа во избежание потери им заданных ростовых свойств.

11. Вычисление результатов измерения

Расчет концентрации клеток производят по формуле:

$$K = (П \times 1\,000) / C \times T \quad \text{кл./м}^3\text{, где}$$

K – концентрация *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 в воздухе, кл./м^3;

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

1 000 – коэффициент пересчета на 1 м^3 воздуха;

C – скорость аспирации воздуха, л/мин;

T – время аспирации, мин.

12. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по ниже приведенной форме.

Протокол №
количественного микробиологического анализа *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 в воздухе рабочей зоны

1. Дата проведения анализа _____
2. Рабочее место (профессия работающего) _____
3. Место отбора пробы (название и адрес организации, производство, технологическая стадия, точка отбора пробы) _____
3. Вид пробоотборника _____
4. Дата последней метрологической поверки оборудования для отбора проб ___
5. Питательная среда, время инкубации _____
6. Результаты испытания ростовых свойств питательной среды _____
7. Количественная и качественная характеристика выросших колоний (количество типичных колоний) _____
8. Результаты идентификации микроорганизмов *B. thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 (морфологические признаки) _____
9. Результаты расчета концентрации штамма _____
10. Соотношение полученных результатов с уровнем ПДКр.з. _____
11. Отбор пробы произведен (Ф.И.О., должность, дата, подпись) _____
12. Идентификация штамма и расчет концентрации проведены (Ф.И.О., должность, дата, подпись) _____

Метод микробиологического измерения концентрации *Bacillus thuringiensis ssp. toumanoffi* 25 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3526—18

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 27.12.18

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75

Тираж 100 экз. Заказ 85

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.: 8 (495) 633-86-59

gost.e-ecolog.ru