Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации *Corynebacterium glutamicum* H150 (*Brevibacterium flavum*) ВКПМ B-12692 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3528—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 *Corynebacterium glutamicum* H150 (*Brevibacterium flavum*) ВКПМ B-12692 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3528—18

ББК 51.21+51.24
М54

М54 **Метод** микробиологического измерения концентрации *Corynebacterium glutamicum* H150 (*Brevibacterium flavum*) ВКПМ В-12692 в воздухе рабочей зоны: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.—8 с.

ISBN 978–5–7508–1636–1

1. Разработаны и подготовлены ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (проф., д.б.н. 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 51.21+51.24

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 17.07.18

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,5

Тираж 100 экз. Заказ 36

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) 952-50-89

© 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 *Corynebacterium glutamicum* H150 (*Brevibacterium flavum*) ВКПМ B-12692 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3528—18

1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода микробиологического количественного анализа концентрации *Corynebacterium glutamicum* H150 (*Brevibacterium flavum)* ВКПМ B-12692 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 *Corynebacterium glutamicum* H150 (*Brevibacterium flavum)* ВКПМ B-12692 и его гигиенический норматив в воздухе рабочей зоны

Штамм *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) H150 происходит от одноименного штамма ВКПМ B-12504, продуцент лизина, не является генетически-инженерно-модифицированным штаммом.

Corynebacterium относится к роду бактерий и порядку *Actinomycetales*. Виды этого рода являются грамм положительными аэробными микроорганизмами и представлены неподвижными овальными или слегка удлиненными палочками, которые не образуют спор.

Штамм растет на средах, обогащенных углеводами: МПА, L-среда, 2LB-среда с мальтозой (20,0 г/л). Колонии интенсивно желтого цвета округлой формы, приподняты над поверхностью, края колоний ровные,

консистенция нетягучая, клетки легко отделяются друг от друга. Оптимальная температура – 30 °С, время выращивания – 1—2 сут.

Депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов ФГУП ГосНИИ Генетика под номером ВКПМ В-12692.

Штамм *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) Н150 ВКПМ В-12692 не является фито- и зоопатогенным, а также не входит в состав 4 групп патогенности в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими правилами 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 выполнение 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. Метод измерений

Метод основан на аспирации из воздуха рабочей зоны клеток и подсчете 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, реактивы и материалы.

5.1. Средства измерений

Барометр-анероид с диапазоном измерения атмосферного давления 5—790 мм рт. ст. и с 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 других 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) 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 9398-005-0576-9082—03
Петля бактериологическая	
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556—81
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76

Примечание. Допускается применение другого оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

5.3. Реактивы и питательные среды

Агар микробиологический	ГОСТ 17206—96
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—90
Дрожжевой экстракт, сухой	ГОСТ 17206—84
Натрий хлористый	ГОСТ 4233—77
Патока мальтозная	ГОСТ 55316—12
Спирт этиловый технический	ГОСТ 17299—78

Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ Р 51652—2000 или ГОСТ 18300—87
Триптон	

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

6. Требования безопасности

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

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

6.2. Дополнения и изменения 1 к СП 1.3.2322—08. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2518—09.

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 допускают лиц с высшим или средним специальным образованием, прошедших соответствующую подготовку и имеющих 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 2LB-среды

Для приготовления среды 2LB используют отдельные компоненты среды следующего состава (г/1 000 $см^3$): триптон – 20,0 г; 50%-я патока мальтозная – 20,0 г; дрожжевой экстракт – 10,0 г; агар-агар – 15,0 г; натрий хлористый – 10,0 г; дистиллированная вода – 1 000 $см^3$.

Сухие компоненты растворяют в 1 000 $см^3$ дистиллированной воды, 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.

Готовую среду хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8 °С в течение 10 дней, не более. Раствор мальтозы 50%-й готовится и стерилизуется отдельно. При разливе среды в чашки Петри добавляется из расчета 40 мл/л 50%-я мальтоза.

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 прямым методом стерильную агаризованную среду (2LB) расплавляют, остужают до 50—60 °С и разливают в чашки Петри. Затем добавляют из расчета 40 мл/л стерилизованный 50%-й раствор мальтозы.

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—3 суток проводят 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 *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) Н150 ВКПМ В-12692 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 проводят по формуле:

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

K – концентрация штамма 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
***Corynebacterium glutamicum* Н150 ВКПМ В-12692 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 *Corynebacterium glutamicum* Н150 ВКПМ В-12692 (морфологические признаки) _____
9. Результаты расчёта концентрации штамма _____
10. Соотношение полученных результатов с уровнем $ПДК_{р.з.}$ _____
11. Отбор пробы проведён (Ф.И.О., должность, дата, подпись) _____
12. Идентификация штамма и расчёт концентрации проведены (Ф.И.О., должность, дата, подпись) _____

gost.e-ecolog.ru