Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Микробиологическое измерение концентрации *Beijerinckia fluminensis* Bf 2806 ВКПМ B-12258 в атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания
МУК 4.2.3434—17

Издание официальное

Москва • 2017

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Микробиологическое измерение концентрации *Beijerinckia fluminensis* Bf 2806 ВКПМ В-12258 в атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания
МУК 4.2.3434—17

ББК 51.21
М59

М59 **Микробиологическое** измерение концентрации *Beijerinckia fluminensis* Bf 2806 ВКПМ В-12258 в атмосферном воздухе населенных мест: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017.—8 с.

ISBN 978—5—7508—

1. Разработаны и подготовлены ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени 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 22 декабря 2016 г. № 2).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 22 февраля 2017 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.21

Ответственный за выпуск Н. В. Карташева

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

Подписано в печать 09.10.17

Формат 60x84/16 Печ. л. 0,5

Тираж 125 экз. Заказ

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
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2017

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
22 февраля 2017 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Микробиологическое измерение концентрации *Beijerinckia fluminensis* Bf 2806 ВКПМ B-12258 в атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания МУК 4.2.3434—17

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода микробиологического количественного анализа концентрации *Beijerinckia fluminensis* Bf 2806 ВКПМ B-12258 в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 50 до 50 000 клеток в 1 м ^{3} воздуха.

1.2. Методические указания носят рекомендательный характер.

2. Биологическая характеристика штамма *Beijerinckia fluminensis* Bf 2806 ВКПМ B-12258 и его гигиенический норматив в атмосферном воздухе населенных мест

Штамм *Beijerinckia fluminensis* Bf 2806 ВКПМ B-12258 выделен из окультуренных почв методом многоступенчатой аналитической селекции, не является генетически модифицированным штаммом. Штамм предполагается использовать для производства биоудобрений в растениеводстве. Активность производственного штамма не менее 5×10^6 кл./мл.

Таксономическое положение штамма

Царство	*Bacteria*
Подцарство	*Proteobacteria*
Класс	*Alphaproteobacteria*
Порядок	*Rhizobiales*
Семейство	*Beijerinckiaceae*

Род	*Beijerinckia*
Вид	*fluminensis*
Штамм	Bf 2806

Культурально-морфологические особенности штамма: на среде Федорова штамм образует круглые, выпуклые, непрозрачные, бесцветные, слизистые колонии диаметром 2,0—4,0 мм, гладкие с ровным краем, тягучей консистенции. На агаризованной среде Бэрка – блестящие голубоватые колонии.

При микроскопировании через 18 ч при температуре 28—30 °С можно видеть мелкие подвижные палочковидные клетки 1,0 × 2,0 мкм, длина варьирует вплоть до кокковидной формы. В зрелой культуре через 48 ч роста наблюдаются мелкие укороченные палочки, в основном одиночно расположенные. Эндоспор не образует. Клетки подвижны, имеют перитрихиальные жгутики. Грамотрицательные, каталазоположительные, непротеолитические, но могут использовать нитрат, аммиак и аминокислоты как источники азота, а крахмал и манит в качестве источников углеводов.

Штамм *Beijerinckia fluminensis* Bf 2806 не является зоо- и фитопатогенным, не относится к микроорганизмам, патогенным для человека (СП 1.3.2322—08), депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ В-12258.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в атмосферном воздухе населенных мест – 5 000 кл/м^3.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений количества клеток в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 50 до 50 000 клеток в 1 м^3 воздуха при доверительной вероятности 0,95.

4. Методы измерений

Прямой метод основан на аспирации из атмосферного воздуха населенных мест бактерий на агаризованную среду Федорова 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 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—74
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 (28 ± 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 51935-2002
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)	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 оборудования и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

5.3. Реактивы и питательные среды

Агар микробиологический	ГОСТ 17206—96
Аммоний молибденовокислый, хч	ГОСТ 3765—78
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—90
Железо сернокислое, хч	ГОСТ 6981—94
Калий однозамещенный фосфорнокислый, хч	ГОСТ 4198—75
Кальций углекислый, хч	ГОСТ 4530—76
Кислота борная, хч	ГОСТ 18704—78
Магний сернокислый, хч	ГОСТ 4523—77
Марганец сернокислый 5-водный, чда	ГОСТ 435—77
Меласса свекловичная	Р 52304—05
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ Р 51652—2000 или ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый технический	ГОСТ 17299—78

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

6. Требования безопасности

При выполнении измерений концентрации клеток в атмосферном воздухе населенных мест соблюдают требования, изложенные в следующих документах.

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

6.2. Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Дополнения и изменения № 1 к СП 1.3.2322—08: СП 1.3.2518—09.

6.3. Правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.005—88.

6.4. Электробезопасность при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019—79 и инструкции по эксплуатации прибора.

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 питательных сред

Для приготовления агаризованной среды Федорова смешивают указанные компоненты (г/дм^3): калий однозамещенный фосфорнокислый – 0,5 г, магний сернокислый – 0,3 г, натрий хлористый – 0,3 г, железо сернокислое – 0,005 г, марганец сернокислый – 0,005 г, аммоний молибденовокислый – 0,005 г, борная кислота – 0,005 г, кальций углекислый – 3,5 г, меласса – 30,0 г, агар-агар – 17,0 г. Сухие компоненты растворяют в 1,0 дм^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают и нагревают до полного растворения агара.

Смесь нагревают до растворения агара, стерилизуют автоклавированием при 121 °С в течение 15 мин и охлаждают до 60 °С. 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 14 дней, не более.

10. Проведение измерения

10.1. Условия отбора проб воздуха

Отбор проб воздуха проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 17.2.4.02—81 «Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ» и Р 8.563—96 «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 зависят от предполагаемой концентрации микроорганизма.

Аппарат перед каждым отбором пробы воздуха тщательно протирают 96%-м этиловым спиртом. Особенно тщательно обрабатывают поверхность подвижного диска и внутреннюю стенку прибора, наружную и внутреннюю стенки крышки. На подвижный 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 (среда Федорова) 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 (28 ± 2) °С. Через 1—2 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 *Beijerinckia fluminensis* Bf 2806 ВКПМ В-12258 высевается на 2—3 чашки используемой среды.

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

11. Вычисление результатов измерения

Расчет концентрации клеток проводят по формуле:

$$K = \frac{П \cdot 1\,000}{C \cdot T}$$ кл./м^3, где

K – концентрация *Beijerinckia fluminensis* Bf 2806 ВКПМ В-12258 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 следующей форме.

Протокол № ___
количественного микробиологического анализа штамма *Beijerinckia fluminensis* Bf 2806 ВКПМ В-12258 в атмосферном воздухе населенных мест

1. Дата проведения анализа _____
2. Рабочее место (профессия работающего)_____
3. Место отбора пробы (название и адрес организации, производство, технологическая стадия, точка отбора пробы) _____
4. Вид пробоотборника_____
5. Дата последней метрологической поверки оборудования для отбора проб _____
6. Питательная среда, время инкубации _____
7. Результаты испытания ростовых свойств питательной среды _____
8. Количественная и качественная характеристика выросших колоний (количество типичных колоний) _____
9. Результаты идентификации микроорганизмов *Beijerinckia fluminensis* Bf 2806 ВКПМ В-12258 (микроморфологические признаки) _____
10. Результаты расчета концентрации штамма _____
11. Соотношение полученных результатов с уровнем $ПДК_{а.в.}$ _____
12. Отбор пробы проведен (Ф. И. О., должность, дата. подпись) _____

13. Идентификация штамма и расчет концентрации проведены (Ф. И. О., должность, дата, подпись) _____

gost.e-ecolog.ru