Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Микробиологическое измерение концентрации *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 ВКПМ B-12259 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3435—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 *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 ВКПМ B-12259 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3435—17

ББК 51.21
М59

М59 **Микробиологическое** измерение концентрации *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 ВКПМ В-12259 в воздухе рабочей зоны: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017.—8 с.

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 *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 ВКПМ B-12259 в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.2.3435—17

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода микробиологического количественного анализа концентрации *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 ВКПМ B-12259 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 *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 ВКПМ B-12259 и его гигиенический норматив в воздухе рабочей зоны

Штамм *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 выделен из окультуренных почв методом многоступенчатой аналитической селекции, не является генетически модифицированным штаммом. Предполагается использовать для производства бактериальных удобрений, а также для профилактики и лечения грибковых заболеваний в растениеводстве. Производственная активность штамма не менее $1{,}2 \times 10^8$ кл/мл.

Таксономическое положение штамма

Царство	*Bacteria*
Подцарство	*Firmicutes*
Класс	*Bacilli*
Порядок	*Bacillales*
Семейство	*Paenibacillaceae*
Род	*Paenibacillus* (Ash et al. 1994)
Вид	*mucilaginosus*
Штамм	Pm 2906

Paenibacillus (лат.) – род аэробных грамположительных спорообразующих палочковидных бактерий. Ранее представители этого рода входили в рРНК третью группу рода *Bacillus*, в 1993 году Эш, Прист и Коллинс предложили вывести представителей группы 3 в отдельный род *Paenibacillus*. Название рода произошло от латинского слова «*paene*» («почти») – в названии рода отражено сходство с родом *Bacillus* (название рода можно буквально перевести как «почти бациллы»).

Род представлен палочковидными бактериями, образующими термоустойчивые эндоспоры. Некоторые виды подвижны и имеют жгутики. Большинство представителей – мезофилы, есть термофильные представители. Представители рода обитают в почве, ризосфере растений, есть эндофитные представители, колонизирующие ткани растений. Многие представители продуцируют антимикробиальные вещества, проявляющие бактерицидное и фунгицидное действие.

Штамм *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 характеризуется следующими культурально-морфологическими признаками: на среде Эшби наблюдаются слизистые, прозрачные, бесцветные или светло-серые колонии, выпуклые или слегка приплюснутые, блестящие с ровными краями.

Микроскопически различаются неподвижные крупные палочковидные клетки правильной формы с округлыми краями, располагаются одиночно или парами, окруженные слизистой оболочкой, образуют эндоспоры.

Для культивирования используется агаризованная среда Эшби, оптимальная температура (30 ± 2) °С.

Физиолого-биохимические признаки: в качестве углерода усваивает глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, гидролизует крахмал. В качестве источника азота может быть использован аммонийный азот, карбамид, нитраты. Штамм обладает способностью растворять нерастворимые или малорастворимые соединения фосфора и калия (трикальцийфосфат, силикаты).

Штамм *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 не является зоо- и фитопатогенным, не патогенен для человека (СП 1.3.2322—08), депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ В-12259.

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. Методы измерений

Прямой метод основан на аспирации из воздуха рабочей зоны бактерий на среду Эшби 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, реактивы и питательные среды.

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 (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 9398-005-0576-9082—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
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—90
Глюкоза	ГОСТ 6038—79
Калий сернокислый, хч	ГОСТ 4145—74
Калий фосфорнокислый двузамещенный, хч	ГОСТ 2493—75
Кальций углекислый, хч	ГОСТ 4530—76
Магний сернокислый, хч	ГОСТ 4523—77
Маннит	ГОСТ 8321—74
натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Сахароза	ГОСТ 5833—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 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 Эшби используют компоненты следующего состава: маннит, сахароза или глюкоза – 20,0 г, калий сернокислый – 0,2 г, калий фосфорнокислый двузамещенный – 0,2 г, кальций углекислый – 5,0 г, магний сернокислый – 0,2 г, натрий хлористый – 0,2 г, агар-агар – 15,0 г. 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.

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 «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 агаризованную среду Эшби 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 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 *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 ВКПМ B-12259 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:

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

K – концентрация *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 ВКПМ B-12259 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 нижеприведенной форме.

Протокол № ___
количественного микробиологического анализа *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 ВКПМ B-12259 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) _____
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 *Paenibacillus mucilaginosus* Pm 2906 ВКПМ B-12259 (микроморфологические признаки)_____
10. Результаты расчета концентрации штамма _____
11. Соотношение полученных результатов с уровнем $ПДК_{в.р.з.}$ _____
12. Отбор пробы проведен (Ф. И. О., должность, дата, подпись) _____
13. Идентификация штамма и расчет концентрации проведены (Ф. И. О., должность, дата, _____

gost.e-ecolog.ru