Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Микробиологическое измерение концентрации *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.1.3380—16

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 *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3380—16

ББК 51.24
М59

М59 **Микробиологическое** измерение концентрации *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д в воздухе рабочей зоны: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017.—8 с.

ISBN 978—5—7508—1572—2

1. Разработаны и подготовлены ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (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 20 мая 2016 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 12 июля 2016 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.24

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

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

Подписано в печать 30.03.17

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,5

Тираж 125 экз. Заказ 26

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
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
12 июля 2016 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Микробиологическое измерение концентрации *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.2.3380—16

1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода микробиологического количественного анализа концентрации *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д в воздухе рабочей зоны 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 *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д и его гигиенический норматив в воздухе рабочей зоны

Штамм *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д выделен из почвы вокруг ризосферы овса, не является генетически модифицированным штаммом. *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д проявляет высокую антагонистическую активность в отношении широкого ряда фитопатогенных грибов, обладает устойчивостью к ряду антибиотиков и способен расти на средах с нафталином в качестве единственного источника углерода.

Штамм является активным компонентом микробиологического фунгицида псевдобактерин-3. Препарат предназначен для предпосевной обработки семян, для обработки сельскохозяйственных культур в период вегетации с целью защиты растений и посадочного материала от бактериальных и грибных заболеваний в сельскохозяйственном производстве и личных подсобных хозяйствах.

Клетки палочковидные размером (0,6—0,8 × 1,7—2,2) мкм, подвижные с перитрихиями, грамотрицательные, спор не образуют.

Штамм хорошо растет на следующих средах: LB (бакто-триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, хлористый натрий – 10 г/л, pH 7,2); Кинг Б, триптозо-соевом агаре; минеральной синтетической среде М9 или минеральной синтетической среде М9 с нафталином (1—2 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии.

Морфологию колоний на питательных средах определяют после 4—5 суток роста при 28 °С. На LB колонии круглые с ровными краями, гладкие, слабовыпуклые, непрозрачные, оранжевые, неслизистой консистенции, диаметр 4—5 мм, пигмент желто-оранжевый, диффундирующий в среду. На триптозо-соевом агаре колонии крупнее, интенсивнее окрашены, более интенсивная диффузия в среду пигмента. На Кинг Б колонии желто-зеленые, флюоресцирующие, пигмент интенсивный, зеленый, флюоресцирующий, со временем приобретает желто-оранжевую окраску. На М9 с нафталином колонии округлые, слабовыпуклые, непрозрачные, матово-белые.

Физиолого-биохимические признаки: облигатный аэроб, температурный оптимум роста 24—30 °С, растет при 4 °С, растет в пределах pH среды от 5,2 до 8,0. Разжижает желатин. В качестве источника углерода использует глюкозу, сахарозу, декстрозу, глицерин, бензойную кислоту, янтарную кислоту, салициловую кислоту, нафталин, фенантрен, 2-метил-нафталин.

Штамм *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером ВКМ-2391Д.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воздухе рабочей зоны – 5 000 кл/м^3, пометка А.

3. Пределы измерений

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

4. Методы измерений

Метод основан на аспирации из воздуха производственных помещений бактерий на LB-среду 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 (28 ± 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)	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
Бакто-триптон	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—90
Дрожжевой экстракт	ГОСТ 10444.1—84
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 воздухе рабочей зоны соблюдают требования следующих нормативных документов:

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

– СП 1.3.2518—09 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Дополнения и изменения 1 к СП 1.3.2322—08»;

– ГОСТ Р 12.1.019—09 «ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты» 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 LB среды смешивают указанные компоненты (г/дм^3): бакто-триптон – 10,0 г; дрожжевой экстракт – 5,0 г; натрий хлористый – 10,0 г; агар-агар – 17,0 г. Сухие компоненты растворяют в 1,0 дм^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают.

Смесь нагревают до полного растворения агара, стерилизуют автоклавированием при 121 °С в течение 15 мин и охлаждают до 60°. Приготовленную среду разливают в стерильные колбы по 250—500 см^3 и повторно 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. 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 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 LB-среду 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 ч. 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 *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д высевается на 2—3 чашки используемой среды.

Возможны только 2—3 пассажа лиофилизованной культуры музейного штамма во избежание потери им заданных ростовых свойств.

11. Вычисление результатов измерения

Расчет концентрации клеток производят по формуле:

$$K = \frac{П \cdot 1000}{C \cdot T}, \text{ где}$$

K – концентрация *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д 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
***Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д 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 *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ-2391Д (морфологические признаки) _____
10. Результаты расчета концентрации штамма _____
11. Соотношение полученных результатов с уровнем $ПДК_{р.з}$ _____
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