УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
24 октября 2003 г.
Дата введения: 1 декабря 2003 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* 65 – продуцента нейтральной протеиназы и амилазы в атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания МУК 4.2.1769—03

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *B. subtilis* 65 – продуцента нейтральной протеиназы и амилазы в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 50 до 50 000 клеток в 1 м^3 воздуха.

Методические указания разработаны 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».

Методические указания предназначены для применения в лабораториях предприятий, организаций и учреждений, аккредитованных в установленном порядке на право проведения микробиологических исследований.

Методические указания одобрены и рекомендованы секцией «Гигиенические аспекты биотехнологии и микробного загрязнения окружающей среды» Проблемной комиссии «Научные основы гигиены окружающей среды».

gost.e-ecolog.ru

2. Биологическая характеристика B. subtilis 65 и его гигиенический норматив

Штамм-продуцент растет на жидких и агаризованных средах. Оптимальная температура роста 37 °С, оптимальная pH 6,6—7,2, культивирование 18—24 часа. Для размножения используется мясопептонная агаризованная среда (МПА) с глюкозой (1 %).

Систематическое положение микроорганизма

Класс	*Schizomycetes*
Отряд	*Eubacteriales*
Семейство	*Bacillaceae*
Род	*Bacillus*
Вид	*subtilis*
Штамм	*65*

На МПА штамм образует небольшие округлые колонии, максимальный диаметр которых составляет 0,5—0,7 см. Край колоний изрезанный, с характерным белым налетом в центральной верхней части. Колонии гладкие, плоские, матовые, сухие. Не врастают в агар и легко отделяются от него. Цвет от слабо кремового до желтоватого.

Морфологически штамм представлен подвижными мелкими палочками, образующими центрально расположенные эндоспоры, располагаются поодиночке или цепочками различной длины. Палочки снабжены жгутиками, расположенными перитрихиально.

B. subtilis 65 строгий аэроб, сапрофит, мезофил, грамположителен. Штамм интенсивно разлагает белковые среды благодаря действию протеолитических энзимов, при этом, на желатине происходит разжижение, на среде лакмус-молоко – пощелочение, пептонизация. Чувствителен к целому ряду антибиотиков, устойчив к ампицилину.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в атмосферном воздухе рабочей зоны – 4 000 кл/м^3, пометка А.

3. Пределы измерений

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

4. Метод измерений

Прямой метод основан на аспирации из воздуха клеток микроорганизма на агаризованную среду МПА с глюкозой (1 %) и подсчета количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам.

Косвенный метод основан на аспирации из воздуха клеток микроорганизма на поверхность плотной питательной среды (молочный агар Эйкмана) и подсчета прозрачных зон, образующихся вокруг выросших колоний и четко выделяющихся на общем молочно-мутном фоне среды через 18—24 часа.

При данном методе на одной чашке Петри после забора пробы может быть учтено не более 50 колоний т. к. большее количество колоний на чашке образуют сливающиеся зоны пептонизации молочного белка казеина.

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

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

5.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы

Прибор для бактериологического анализа воздуха, модель 818 (щелевой прибор Кротова)	ТУ 64-12791—77
Термостаты электрические суховоздушные или водяные	
Автоклав электрический	ГОСТ 9586—75
Бокс, оборудованный бактерицидными лампами	
Холодильник бытовой	
Весы лабораторные, аналитические типа ВЛА-200	
Микроскоп биологический с иммерсионной системой типа «Биолам» Л-211	
Лупа с увеличением х10	ГОСТ 25706—83
Чашки Петри бактериологические плоскодонные, стеклянные, диаметром 100 мм	
Пробирки биологические, вместимостью 20 и 35 мл	ГОСТ 10515—75
Пипетки мерные на 1, 5, и 10 мл	ГОСТ 1770—74
Колбы конические, вместимостью 250 и 500 мл	ГОСТ 1770—74
Секундомер	ГОСТ 9586—75

Барометр	ГОСТ 246 96—79
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556—81

5.2. Реактивы, растворы

Антибиотики: ампициллина натриевая соль, нистатин

Спирт этиловый ректификат ГОСТ 5962—67

Агаризованная среда МПА с глюкозой (глюкоза – 1 %, агар – 1,5—1,8 %, pH 6,6—7,2, режим стерилизации 1,1—1,2 ати в течение 30 мин)

Молочный агар Эйкмана (10 мл среды МПА и 2,5—3 мл стерильного молока – содержание жира не более 2 %, белка – 2,8 % – смешать ex tempore)

6. Требования безопасности

При выполнении измерений концентрации клеток штамма-продуцента в атмосферном воздухе соблюдают следующие требования:

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

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

6.3. «Инструкции по устройству, требованиям безопасности и личной гигиены при работе в микробиологических лабораториях предприятий микробиологической промышленности» (1977).

6.4. 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

Процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят в нормальных условиях при температуре воздуха

(20 ± 5 °С), атмосферном давлении 630—800 мм рт. ст. и влажности воздуха не более 80 %.

9. Проведение измерения

9.1. Условия отбора проб воздуха

Для определения концентрации клеток микроорганизма воздух аспирируют при помощи аппарата Кротова со скоростью 10 л/мин на поверхность плотной питательной среды МПА или молочный агар Эйкмана. Время аспирации воздуха (5—20 мин) зависит от предполагаемой концентрации клеток штамма-продуцента.

Аппарат Кротова перед каждым отбором пробы воздуха тщательно протирают 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. 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.

9.2. Выполнение анализа

При выполнении анализа воздуха прямым методом агаризованную среду МПА расплавляют, остужают до 50—60 °С, добавляют свежеприготовленный в стерильной дистиллированной воде раствор антибиотика ампициллина из расчета 10—15 мкг на 1 мл среды (для подавления посторонней бактериальной микрофлоры), раствор нистатина из расчета 10 мкг на 1 мл среды (для подавления грибковой флоры), стерильный раствор глюкозы (1 %), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

При выполнении анализа воздуха косвенным методом к уже приготовленному МПА добавляют, соблюдая все правила асептики, стерильного молока из расчета 10 мл МПА и 2,5—3,0 мл молока и разливают по 10 мл в стеклянные чашки Петри на горизонтальной поверхности.

Чашки с застывшей средой помещают в термостат на сутки при температуре 37 °С, после чего проросшие чашки бракуют, стерильные чашки используют для контроля воздуха.

После отбора проб воздуха чашки Петри помещают в термостат на 37 °С. Через 18—24 часов производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам (прямой метод) или прозрачных зон вокруг выросших колоний продуцента на общем молочно-мутном фоне среды (косвенный метод), как результат ферментативного действия нейтральной протеиназы на молочный белок – казеин.

10. Вычисление результатов измерения

Расчет концентрации клеток продуцента в пересчете на 1 м³ воздуха производят по формуле:

$$X = \frac{N \cdot 1\,000}{V} кл/м^3, \text{ где}$$

X – концентрация клеток продуцента в воздухе;

N – количество зон вокруг колоний продуцента, выросших на чашке;

1 000 – коэффициент пересчета на 1 м³ воздуха;

V – объем воздуха, л (произведение скорости на время аспирации).

11. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по форме.

Протокол №
количественного микробиологического анализа
штамма-продуцента *Bacillus subtilis* 65
в атмосферном воздухе населенных мест

1. Дата проведения анализа _____
2. Место отбора пробы_____
3. Название лаборатории _____
4. Юридический адрес организации _____

Результаты микробиологического анализа

Шифр или № пробы	Определяемый микроорганизм	Концентрация, кл/м³

Ответственный исполнитель
Научный руководитель

Список литературы

1. Руководство по контролю загрязнения атмосферы: РД 52.04.186—96. М., 1991. 693 с.

2. ГОСТ 8.563—96. ГСИ. «Методики выполнения измерений».

3. Положение об организации работы по технике безопасности в микробиологической промышленности. М., 1980. 27 с.

4. Инструкции по устройству, требованиям безопасности и личной гигиены при работе в микробиологических лабораториях предприятий микробиологической промышленности. М., 1977. 7 с.

5. ГОСТ 17.2.4.02—81 «Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ». М.: Изд-во стандартов, 1981. – 3 с.

gost.e-ecolog.ru