Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение концентраций штаммов микроорганизмов в атмосферном воздухе населенных мест

Сборник методических указаний
МУК 4.2.3249—14
МУК 4.2.3251—14
МУК 4.2.3253—14
МУК 4.2.3255—14
МУК 4.2.3257—14

Выпуск 1

Издание официальное

Москва • 2015

gost.e-ecolog.ru

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

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение концентраций штаммов микроорганизмов в атмосферном воздухе населенных мест

Сборник методических указаний
МУК 4.2.3249—14
МУК 4.2.3251—14
МУК 4.2.3253—14
МУК 4.2.3255—14
МУК 4.2.3257—14

Выпуск 1

ББК 51.21
И37

И37 **Измерение** концентраций штаммов микроорганизмов в атмосферном воздухе населенных мест: Сборник методических указаний. Вып. 1.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015.—40 с.

ISBN 978—5—7508—1414—5

1. Разработаны и подготовлены ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет 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 6.11.2014 № 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 30 декабря 2014 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.21

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

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

Подписано в печать 21.08.15

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,5

Тираж 150 экз. Заказ 54

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
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2015
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015

Содержание

Микробиологическое измерение концентрации *Rhodococcus jialingiae 1kp* ВКПМ Ac-1957 в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.3249—14 5

Микробиологическое измерение концентрации *Azotobacter chroococcum* ВН-1811 ВКПМ B-9029 в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.3251—14 12

Микробиологическое измерение концентрации *Bacillus mucilaginosus* Bac-10 ВКПМ B-8966 в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.3253—14 19

Микробиологическое измерение концентрации *L. xylanilyticus 5rb* ВКПМ B-11685 в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.3255—14 26

Микробиологическое измерение концентрации *Yarrowia lipolytica 2kp* ВКПМ Y-4043 в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.3257—14 33

Введение

Сборник методических указаний «Измерение концентраций штаммов микроорганизмов в атмосферном воздухе населенных мест» (выпуск 1) разработан с целью обеспечения контроля соответствия фактических концентраций микроорганизмов их предельно допустимым концентрациям (ПДК), что является обязательным при осуществлении санитарно-эпидемиологического контроля.

Включенные в данный сборник методические указания по контролю биотехнологических штаммов в атмосферном воздухе населенных мест 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».

Методики выполнены с использованием современных и адекватных микробиологических методов исследования и позволяют контролировать концентрации биотехнологических штаммов микроорганизмов на уровне и ниже их ПДК в атмосферном воздухе населенных мест, установленных в гигиенических нормативах.

Методические указания по измерению концентраций штаммов микроорганизмов в атмоферном воздухе населенных мест предназначены для лабораторий центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, санитарно-микробиологических лабораторий промышленных предприятий, а также для научно-исследовательских институтов и других заинтересованных министерств и ведомств, аккредитованных в установленном порядке на право проведения микробиологических исследований, для осуществления контроля за содержанием штаммов в атмосферном воздухе населенных мест.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
30 декабря 2014 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Микробиологическое измерение концентрации *Yarrowia lipolytica 2kp* ВКПМ Y-4043 в атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания МУК 4.2.3257—14

1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода микробиологического количественного анализа концентрации *Y. lipolytica 2kp* ВКПМ Y-4043 в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 5 до 5 000 клеток в 1 $м^3$ воздуха.

1.2. Методические указания носят рекомендательный характер.

2. Биологическая характеристика штамма *Y. lipolytica 2kp* ВКПМ Y-4043 и его гигиенический норматив в атмосферном воздухе населенных мест

Дрожжевая культура *Yarrowia lipolytica 2kp* выделена из загрязненных нефтепродуктами воды/стоков Московской области, природный изолят. Штамм отобран по способности эффективно снижать содержание нефти в загрязненной ею воде, песке и почвах. Растет на средах с гексадеканом и нефтью в качестве единственных источников углерода.

Является компонентом биопрепарата по биоремедиации почв, грунтов, водоемов и стоков от нефти и нефтепродуктов.

По результатам проведенного анализа нуклеотидной последовательности, кодирующей часть 18S рРНК исследуемого штамма установлено, что исследуемый штамм *Yarrowia lipolytica* (98 %).

Аэроб. Способен к росту на средах, содержащих источники углерода.

Мезофил. Рост очень хороший – через 24 ч при 25—28 °С образует колонии на глюкозо-пептонном агаре (ГПА). При температуре 42 °С не растет. Выдерживает концентрации хлорида натрия до 1 % и немного более.

Штамм растет на агаризованных средах (ГПА, МПА, АГВ-среда, картофельный агар (КА). Можно культивировать в LB-бульоне и на LB-агаре или глюкозо-минеральной среде (ГПС).

На ГПА на 1—2-е сутки вырастают колонии белого цвета, сухие, круглые, поднимающиеся над агаром. Края колонии ровные, у старой культуры возможно образование складок и концентрических кругов различной плотности. Максимальный диаметр – 10—12 мм.

Клетки круглые, эллипсоидные или удлиненные. Бесполое размножение – многосторонним почкованием на узком основании. Образуется псевдомицелий или истинный мицелий, который может иногда распадаться на артроспоры. Аски не конъюгативные, образуются из диплоидных клеток гиф. Оболочка аска быстро растворяется. В аске 1—4 аскоспоры, шаровидные, полусферические или шляповидные.

Способен расти в присутствии циклогексимида, обладает уреазной активностью, нитрат не использует, сахара не сбраживает. В роде *Yarrowia* один вид *lipolytica*, известный своей способностью к интенсивному образованию липолитических и протеолитических ферментов. Телеоморфа – *Candida paralipolytica.* Встречается у человека и других млекопитающих, в зерне, маслинах и нефтепродуктах.

Штамм *Yarrowia lipolytica 2kp* депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ Y-4043.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в атмосферном воздухе населенных мест – 50 кл/м^3, пометка А.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений количества клеток в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 5 до 5 000 клеток в 1 м^3 воздуха при доверительной вероятности 0,95.

4. Методы измерений

Метод основан на аспирации из атмосферного воздуха населенных мест клеток псевдомицелия и подсчете количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим 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 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 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—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 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
Пептон сухой ферментативный	ГОСТ 13805—76
Спирт этиловый технический	ГОСТ 17299—78
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ Р 51652—2000 или ГОСТ 18300—87
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Глюкозо-пептонная среда стандартная	
Циклогексимид *син.* актидион	ГОСТ 51921—02
Однозамещенный фосфорно-кислый натрий, хч	ГОСТ 245—76
Серно-кислый магний, хч	ГОСТ 4523—77
Куриный желток	

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

6. Требования безопасности

При выполнении измерений концентрации клеток гриба в атмосферном воздухе населенных мест соблюдают следующие требования.

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

6.2. СП 1.3.2518—09 Дополнения и изменения 1 к СП 1.3.2322—08.

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.

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 питательных сред

9.1. Глюкозо-пептонный агар (ГПА)

Для приготовления используют сухую готовую глюкозо-пептонную среду: 50,0 г порошка размешивают в 1 000 $см^3$ дистиллированной воды. Можно использовать отдельные компоненты среды следующего состава (г/$дм^3$): пептон – 20,0 г; глюкоза – 10,0 г; хлорид натрия – 5,0 г; агар-агар – 15,0 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.

9.2. Желточный агар

Для приготовления желточного агара смешивают указанные компоненты: пептон – 20 г, однозамещенный фосфорно-кислый натрий (Na_2HPO_4) – 2,5 г, хлорид натрия (NaCl) – 1 г, серно-кислого магния ($MgSO_4$) 0,5 %-й раствор – 1 мл, глюкоза – 1 г, агар – 12,5 г, дистиллированная вода – 500 мл. Смесь нагревают до растворения агара, стерилизуют автоклавированием при 121 °С в течение 15 мин и охлаждают до 60°.

Скорлупу яйца дезинфицируют спиртом. Яйцо разбивают, отделяют желток от белка и переносят с соблюдением правил асептики в расплавленный агар. Агар перемешивают до получения однородной суспензии, разливают по чашкам и оставляют до полного затвердевания.

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 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 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 закры-

вают 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 (ГПА) расплавляют, остужают до 50—60 °С, с соблюдением правил асептики вносят стерильный раствор циклогексимида, из расчета 0,5 г/л среды (для подавления посторонней микрофлоры), тщательно перемешивают 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—3 суток производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам (прямой метод).

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 *Y. lipolytica* 2kp ВКПМ Y-4043 высевается на 2—3 чашки используемой среды.

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

Дополнительным функциональным методом является отбор пробы воздуха на чашки Петри с желточным агаром. После отбора проб воздуха чашки инкубируют в термостате при (28 ± 2) °С в течение 48—72 ч и внимательно просматривают в косом освещении. Вокруг колоний штамма, продуцирующего липазу, образуются маслянистые, блестящие с переливами или перламутровые зоны.

11. Вычисление результатов измерения

Расчет концентрации клеток производят по формуле:

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

К – концентрация штамма в воздухе, клеток/м^3;
П – количество типичных колоний, выросших на чашке Петри;
1 000 – коэффициент пересчета на 1 м^3 воздуха;
С – скорость аспирации воздуха, л/мин;
Т – время аспирации, мин.

12. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по следующей форме.

Протокол №
количественного микробиологического анализа штамма *Y. lipolytica 2kp* ВКПМ Y-4043 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) _____
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 *Y. lipolytica 2kp* ВКПМ Y-4043 (микроморфологические признаки) _____
_____
9. Результаты расчёта концентрации штамма_____
10. Соотношение полученных результатов с уровнем ПДК$_{а.в.}$ _____
11. Отбор пробы произведён (Ф.И.О., должность, дата, подпись)
_____
12. Идентификация штамма и расчёт концентрации произведены (Ф.И.О., должность, дата, подпись) _____

gost.e-ecolog.ru