Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы микробиологического измерения концентрации клеток мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз, β-глюканазы и ксиланазы в атмосферном воздухе населенных мест и воздухе рабочей зоны

**Сборник методических указаний
по методам контроля
МУК 4.2.3034—12; 4.2.3035—12**

Издание официальное

Москва • 2012

gost.e-ecolog.ru

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

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы микробиологического измерения концентрации клеток мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз, β-глюканазы и ксиланазы в атмосферном воздухе населенных мест и воздухе рабочей зоны

Сборник методических указаний по методам контроля МУК 4.2.3034—12; 4.2.3035—12

ББК 51.21
М54

М54 **Методы** микробиологического измерения концентрации клеток мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз, β-глюканазы и ксиланазы в атмосферном воздухе населенных мест и воздухе рабочей зоны: Сборник методических указаний по методам контроля.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—16 с.

ISBN 978—5—7508—1127—4

1. Разработаны ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им Н. И. Пирогова» Минздрава России (д.б.н. Н. И. Шеина).

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

3. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 20 июля 2012 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.21

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 9.11.12

Формат 60x88/16 Печ. л. 1.0

Тираж 200 экз. Заказ 64

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, 2012
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012

Содержание

Метод микробиологического измерения концентрации клеток мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз, β-глюканазы и ксиланазы в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.3034—12 4

Метод микробиологического измерения концентрации клеток мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз, β-глюканазы и ксиланазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.3035—12 11

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
20 июля 2012 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз, β-глюканазы и ксиланазы в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.2.3035—12

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз, β-глюканаз и ксиланаз в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 до 50 000 клеток в 1 $м^3$ воздуха.

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005—88 «ССБТ. Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования» и ГОСТ Р8.563—96 «Методики выполнения измерений».

Методические указания предназначены для применения в организациях Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также в санитарных лабораториях биотехнологических предприятий, микробиологических лабораториях научно-исследовательских институтов, работающих в области гигиены окружающей среды и аккредитованных в установленном порядке на право проведения микробиологических исследований.

2. Биологическая характеристика мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D и его гигиенический норматив

Штамм мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D является продуцентом комплекса целлюлаз, β-глюканаз и ксиланаз. Получен с помощью методов многоступенчатого мутагенеза и селекции из исходной культуры *Tr. longibrachiatum* TW-307 ВКМ F-3865D. Депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН под номером ВКМ F-3880D.

Растет на агаризованных средах (Мальц-агар, глюкозо-картофельный агар, среда Чапека с дрожжевым автолизатом, сусло-агар) при *t* 29—34 °С в течение 7 суток, pH 3,5—5,0.

При росте на Мальц-агаре диаметр колоний достигает 80—90 мм на 7-е сутки при росте при *t* 25 °С. Мицелий развит преимущественно субстратный, воздушный мицелий – скудный, белого цвета. Цвет колонии первоначально белый, затем при формировании спор – зеленый. Обратная сторона колоний имеет светло-зеленовато-желтоватую окраску.

При микроскопировании штамм имеет конидии, которые формируются в многочисленных компактных подушечках диаметром до 2 мм. Конидиеносцы бесцветные, гладкостенные формируются на субстратном мицелии, главные ветви которого длинные и прямые, иногда извитые. Боковые ветви короткие, формируются через неравные интервалы под углом к главным ветвям. Фиалиды одиночные, булавовидные или бутыловидные, размер 5—10 × 2—3 мкм. Конидии одноклеточные, зеленоватые, гладкостенные, эллипсоидные размером 4—7 × 2—4 мкм собраны в мелкие головки на вершинах фиалид.

3. Пределы измерений

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

4. Метод измерений

Метод основан на аспирации из воздуха клеток плесневого гриба на поверхность плотной питательной среды и подсчета 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, вспомогательные устройства, материалы

Импактор микробиологический «Флора – 100»	ТУ 9443-001-05031637—02
Прибор для бактериологического анализа воздуха, модель 818 (щелевой прибор Кротова)	ТУ 64-12791—77
Прибор MAS – 100 ECO фирмы Merk (Германия) для отбора проб воздуха	
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 ×10	ГОСТ 25706—83
Чашка Петри бактериологические плоскодонные стеклянные диаметром 90 мм	ГОСТ 23932—90
Пробирки бактериологические П1 и П2 вместимостью 15 и 20 мл	ГОСТ 25336—82
Пипетки мерные на 1, 5 и 10 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 24696—79
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556—81

5.2. Реактивы, растворы

Агар микробиологический	ГОСТ 17206—84
D-Глюкоза (возможно заменить раствором глюкозы для инъекций)	ГОСТ 6038—79
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Спирт этиловый ректификат	ГОСТ 5962—67
Кислота молочная пищевая (для подкисления среды и подавления посторонней бактериальной флоры)	ГОСТ 490—79
Глюкозо-картофельный агар, г/л (очищенный картофель – 200, агар – 18—20, pH 4,5—5,0, режим стерилизации 1,1—1,2 ати в течение 30 мин, глюкоза – 15—20 перед использованием)	

Среда Гетчинсона. г/л (KH_2PO_4 – 0,1; NaCl – 0,1; $CaCl_2$ – 0,1; $FeCl_3$ – 0,1; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,3; $NaNO_3$ – 2,5; агар – 2,0; дистиллированная вода)
0,5 %-й водный раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), вязкость μ 10 мПас, *t* 25 °С, вискозиметр Брукфильда LVF
1 %-й раствор Конго Красного (congo rot)

6. Требования безопасности

При выполнении измерений концентрации клеток штамма-продуцента в воздухе рабочей зоны соблюдают следующие требования.

6.1. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

6.2. ГОСТ 12.1.005—88 «Правила техники безопасности при работе с химическими реактивами».

6.3. ГОСТ 12.1.019—79 «Электробезопасность при работе с электроустановками» и инструкции по эксплуатации прибора.

6.4. Руководство «Положение об организации работы по технике безопасности в микробиологической промышленности» (1980), «Инструкции по устройству, требованиям безопасности и личной гигиены при работе в микробиологических лабораториях предприятий микробиологической промышленности» (1977).

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

Процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят в нормальных условиях при температуре воздуха (20 ± 5) °С, атмосферном давлении (760 ± 20) мм рт. ст. и влажности воздуха не более 80 %.

9. Проведение измерения

9.1. Условия отбора проб воздуха

Для определения концентрации клеток мицелиального гриба воздух аспирируют при помощи пробоотборника «Флора» со скоростью 100 л/мин на поверхность плотной питательной среды. Время аспирации воздуха (1—10 мин) зависит от предполагаемой концентрации клеток штамма-продуцента и от марки пробоотборника.

Аппарат 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 глюкозо-картофельный агар расплавляют, остужают до 50—60 °С, добавляют глюкозу из расчета 15—20 г/л и молочную кислоту из расчета 2,0 мл на 500 мл среды (для подкисления среды и подавления посторонней бактериальной микрофлоры), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

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 29 °С. Через 4—7 суток производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам и характерной окраске колоний микромицета с обратной стороны чашки.

При выполнении анализа дополнительным методом пробы воздуха отбирают на среду Гетчинсона с добавлением 0,5 %-й карбоксиметилцеллюлозы. Культивируют в термостате при *t* 28 °С в течение двух суток и проводят окрашивание 0,1 %-м раствором Конго красным. Учет колоний штамма производится по зонам просветления, образующимся в результате ферментации целлюлозы под действием комплекса целлюлаз.

Ростовые свойства всех используемых питательных сред должны быть проверены в соответствии с «Требованиями к ростовым свойствам питательных сред» (Государственная Фармакопея СССР, изд. XI, вып. 2, с. 208), что позволит более полно оценить пределы ошибки метода. Для этого эталонный музейный штамм-продуцент высевается на 2—3 чашки каждой используемой среды.

10. Вычисление результатов измерения

Расчет концентрации клеток продуцента в пересчете на 1 м^3 воздуха производят по формуле:

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

X – концентрация клеток продуцента в воздухе;

N – количество колоний продуцента, выросших на чашке;

1 000 – коэффициент пересчета на 1 м^3 воздуха;

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

В случае невозможности использования аппарата Кротова, рекомендуем применять метод седиментации клеток продуцента из воздуха непосредственно на чашки Петри с плотной питательной средой. Время отбора проб воздуха может составлять до 30 мин. При использовании этого метода пользуются следующим расчетом концентрации клеток продуцента.

Эмпирически установлено, что за 5 мин на площадь 100 $см^2$ оседает количество бактерий, содержащееся в 10 л воздуха, следовательно за 1 мин – количество бактерий из 2 л воздуха. Площадь чашки Петри диаметром 100 мм равна 78, 54 $см^2$. Составляя пропорцию определяем, что за 1 мин на стеклянную чашку Петри оседают клетки из 1,57 л/мин. Количество клеток в 1 $м^3$ воздуха определяем по вышеприведенной формуле, где V = 1,57 л/мин × t (время аспирации, мин).

Предлагаемый метод является ориентировочным и может быть использовать как вспомогательный метод.

11. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по форме.

Протокол №
количественного микробиологического анализа штамма
***Tr. longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D 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. Количественная и качественная характеристика выросших колоний (количество типичных колоний, морфологические признаки, окраска по Грамму и др.) _____
8. Результаты идентификации микроорганизмов с указанием метода _____
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) _____

Список литературы

1. ГОСТ 12.1.005—88 «ССБТ. Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования».

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

3. Положение об организации работы по технике безопасности в микробиологической промышленности.

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

gost.e-ecolog.ru