Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* 26Д – основного действующего вещества препарата Фитоспорин-М в воздушной среде

Сборник методических указаний по методам контроля МУК 4.2.2901—11; 4.2.2902—11

Издание официальное

Москва • 2011

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 микроорганизма *Bacillus subtilis* 26Д – основного действующего вещества препарата Фитоспорин-М в воздушной среде

Сборник методических указаний по методам контроля МУК 4.2.2901—11; 4.2.2902—11

ББК 51.21
М54

М54 **Методы** микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* 26Д – основного действующего вещества препарата Фитоспорин-М в воздушной среде: Сборник методических указаний.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—19 с.

ISBN 978—5—7508—1005—5

1. Разработаны ГОУ ВПО РГМУ Росздрава (д.б.н. Н. И. Шеина, к.м.н. Л. И. Мялина, к.м.н. В. В. Колесникова, к.м.н. Л. И. Сазонова).

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

3. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 02.06.2011 № 1).

4. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко и введены в действие 12.07.2011.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

ISBN 978—5—7508—1005—5

© Роспотребнадзор, 2011
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

Содержание

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* 26Д – основного действующего вещества препарата Фитоспорин-М в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.2901—11 4

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* 26Д – основного действующего вещества препарата Фитоспорин-М в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.2902—11 12

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
12 июля 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis 26Д* – основного действующего вещества препарата Фитоспорин-М в атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания
МУК 4.2.2902—11

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *B.subtilis* 26Д в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 50 до 500 000 клеток в 1 $м^3$ воздуха.

1.2. Методические указания разработаны в соответствии с требованиями ГОСТ 17.2.4.02—81 «Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ» и ГОСТ Р 8.563—96 «Методики выполнения измерений».

1.3. Методические указания предназначены для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы лабораториями других организаций, аккредитованных в установленном порядке на право проведения микробиологических исследований.

2. Биологическая характеристика *B.subtilis* 26Д.

Штамм *Bacillus subtilis* 26Д является основным действующим компонентом препарата Фитоспорин-М, обладающего широким спектром действия в отношении фитопатогенных грибов из классов фикомицет, базидиомицет и несовершенных грибов, а также фитопатогенных бактерий.

Препаративная форма представляет собой порошок с концентрацией живых клеток и спор *B. subtilis* 26Д не менее 2 млрд/г. В качестве наполнителя используются гуми (2 %) и мел (86—91 %).

Штамм *B. subtilis* 26Д найден в естественных условиях, выделен из хлопчатника в Шаартузском районе Таджикской ССР в 1986 г. Депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИГенетика).

Культурально-морфологические свойства. Культура представлена грамположительными аэробными спорообразующими палочками, продуцирующими каталазу. Культура на МПА и картофельно-глюкозном агаре растет обильно. На МПА образует округлые шероховатые складчатые колонии светло-кремового цвета с неровными краями. На картофельном агаре вырастают светло-кремовые блестящие колонии вязкой консистенции с ровными краями. Штамм культивируют в термостате при 32—37 °С в течение 24—36 ч.

В мазках 18—24-часовой культуры обнаруживаются прямые палочковидные клетки размером 1,9 × 0,5 мкм, расположенные одиночно, попарно или в цепочках. Клетки подвижны. Эндоспоры эллипсовидные размером 0,9 × 0,5 мкм, в клетке расположены центрально.

Культура ферментирует глюкозу, арабинозу, мальтозу, галактозу, лактозу, сахарозу с образованием кислоты без образования газа. Культура гидролизует казеин, крахмал, желатину, не обладает лецитиназной активностью. Штамм непатогенен.

3. Пределы измерений

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

4. Методы измерений

Прямой метод основан на аспирации из атмосферного воздуха населенных мест клеток микроорганизма на МПА и подсчета количества

выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам.

Дополнительные физиолого-биохимические методы основаны на аспирации из воздуха клеток микроорганизма на поверхность плотной селективной питательной среды:

• тест на казеиназу включает использование желточного агара и подсчета зон гидролиза (просветления) вокруг выросших колоний через 24—48 часов. При данном методе на одной чашке Петри после забора пробы может быть учтено не более 50 колоний на чашке, т. к. большее количество колоний на чашке образуют сливающиеся зоны гидролиза, что затрудняет подсчет колоний;

• тест на каталазу проводят путем добавления нескольких капель 3 % перекиси водорода к колониям штамма, выросшим на МПА. Сразу же наблюдают выделение пузырьков, что означает положительную реакцию.

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—2002
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 Возможно также использование других аналогов пробоотборника	
Термостаты электрические	ГОСТ 10444.15—94
Автоклав электрический	ГОСТ 9586—75
Бокс, оборудованный бактерицидными лампами	
Холодильник бытовой	ГОСТ 26678—85
Весы лабораторные ВЛКТ-500	ГОСТ 24104—88
Микроскоп биологический с иммерсионной системой типа «Биолам Л-211»	
Лупа с увеличением ×10	ГОСТ 25706—83
Чашки 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 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—96
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Спирт этиловый ректификат	ГОСТ 5962—67
Мясо-пептонный бульон	ГОСТ 20730—75
Перекись водорода 3 %	
Желточный агар (пептон – 20 г, Na_2HPO_4 – 2,5 г, NaCl – 1 г, $MgSO_4$ 0,5 % раствор – 1 мл, глюкоза – 1 г, агар – 12,5 г, дистиллированная вода – 500 мл, 1 желток с соблюдением правил асептики добавляют *ex tempore*).	

6. Требования безопасности

При выполнении измерений концентрации клеток штамма-продуцента в атмосферном воздухе населенных мест соблюдают следующие требования.

6.1. Санитарные правила СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

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

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

6.4. «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 при температуре воздуха (20 ± 5) °С, атмосферном давлении 740—780 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 пробоотборника со скоростью 100 л/мин на поверхность плотной питательной среды. Время аспирации воздуха (1—5 мин) зависит от предполагаемой концентрации клеток штамма.

Аппарат перед каждым отбором пробы воздуха тщательно протирают 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. 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. Затем 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 с температурой 37 °С. Через 24—48 часов производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам (прямой метод).

При анализе воздуха производственных помещений дополнительными функционально-биохимическими методами пробы воздуха отбирают на чашки Петри с плотной селективной питательной средой (желточный агар, МПА + 3 % H_2O_2).

Желточный агар. Чашки инкубируют в термостате при 37 °С в течение 24—48 часов и наблюдают зоны гидролиза (просветления) вокруг выросших колоний *B. subtilis* 26Д.

МПА + 3 % H_2O_2. Для определения каталазной активности к колониям, выросшим на среде МПА в течение 24—48 часов, добавляют несколько капель перекиси водорода. Появление пузырьков газа свидетельствует о каталазной активности штамма.

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.

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

10. Вычисление результатов измерения

Расчет концентрации клеток производят по формуле:

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

K – концентрация штамма *B. subtilis* 26Д в воздухе, кл/м^3;

$П$ – количество типичных колоний, выросших на чашке Петри;

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

C – скорость аспирации воздуха, л/мин;

τ – время аспирации, мин.

11. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по форме, указанной в прилож. 1.

Приложение 1

Протокол №
количественного микробиологического анализа штамма *B. subtilis* 26Д 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. Количественная и качественная характеристика выросших колоний (количество типичных колоний, морфологические признаки, окраска по Граму) _____
7. Результаты идентификации микроорганизмов с указанием метода _____
_____
8. Результаты расчёта концентрации штамма _____
9. Соотношение полученных результатов с уровнем $ПДК_{а\,в}$ _____
10. Отбор пробы произведён (ФИО, должность, дата, подпись) _____
_____
11. Идентификация штамма и расчёт концентрации произведены (ФИО, должность, дата, подпись) _____

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.

6. Государственная Фармакопея СССР, изд. XI, вып. 2. Общие методы анализа. М.: Медицина, 1990.

7. Лысак Л. В., Добровольская Т. Г., Скворцова И. В. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. М., 2003. С. 120.

Методы микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* 26Д – основного действующего вещества препарата Фитоспорин-М в воздушной среде

Сборник методических указаний по методам контроля МУК 4.2.2901—11; 4.2.2902—11

Редактор Н. В. Кожока
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 29.09.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

Тираж 200 экз. Заказ 123

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

gost.e-ecolog.ru