Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* Ч-13 в атмосферном воздухе населенных мест и воздухе рабочей зоны

Сборник методических указаний
МУК 4.2.2769—10
МУК 4.2.2770—10

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

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* Ч-13 в атмосферном воздухе населенных мест и воздухе рабочей зоны

Сборник методических указаний
МУК 4.2.2769—10
МУК 4.2.2770—10

ББК 51.21
М54

М54 **Метод** микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* Ч-13 в атмосферном воздухе населенных мест и воздухе рабочей зоны: Сборник методических указаний.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—20 с.

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. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 2 от 14.10.2010) и 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 19.11.2010.

4. Введены впервые

ББК 51.21

Редактор Н. В. Кожока
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 30.03.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

Тираж 200 экз. Заказ 63

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, 2011
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

Содержание

1. Общие положения и область применения 4
2. Биологическая характеристика *B.subtilis* Ч-13 и его гигиенический норматив в атмосферном воздухе населенных мест 4
3. Пределы измерений 5
4. Методы измерений 6
5. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы 6
5.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы .. 6
5.2. Реактивы, растворы 7
6. Требования безопасности 7
7. Требования к квалификации операторов 8
8. Условия измерений 8
9. Проведение измерения 8
9.1. Условия отбора проб воздуха 8
9.2. Выполнение анализа 8
10. Вычисление результатов измерения 9
11. Оформление результатов измерений 9
Приложение 1. 10
Список литературы 10

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
19 ноября 2010 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* Ч-13 в атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания МУК 4.2.2769—10

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *B.subtilis* Ч-13 в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 до 500 000 клеток в 1 м ^{3} воздуха.

1.2. 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.

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

2. Биологическая характеристика *B.subtilis* Ч-13 и его гигиенический норматив в атмосферном воздухе населенных мест

Штамм *Bacillus subtilis* Ч-13 является основным действующим началом биофунгицида Бисолбисан и агрохимиката Экстрасол. Инокуляция бактериями *Bacillus subtilis* Ч-13 различных сельскохозяйственных

культур (картофеля, яровой и озимой пшеницы, ячменя, подсолнечника, капусты, моркови, свеклы) в полевых условиях способствует увеличению урожая от 12 до 40 %.

Bacillus subtilis Ч-13 проявляет конкурентно способные и антагонистические свойства по отношению к широкому спектру фитопатогенных бактерий и грибов. Штамм выделен из корней растений пшеницы, из почвы (южный чернозем Республики Молдовы) и депонирован в ГНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН.

Штамм *Bacillus subtilis* Ч-13 характеризуется следующими культурально-морфологическими и биохимическими свойствами: грамположительные аэробные спорообразующие палочки. На МПА, сусло-агаре и картофельном агаре культура растет обильно.

На МПА образует сухие колонии кремового цвета, пастообразной консистенции с неровными изрезанными краями. Максимальный диаметр колоний 20—40 мм. Оптимальная температура роста 37 °С, при t 45 °С и менее 15 °С рост замедлен. Оптимальное значение pH среды 6,8, рост происходит также при pH от 4,5 до 8,0.

В мазках 18-часовой культуры обнаруживаются прямые палочковидные клетки размером 1,0 х 2,0 мкм, расположенные одиночно, реже цепочкой. Споры в клетке расположены центрально.

Штамм *Bacillus subtilis* Ч-13 гидролизует казеин, желатин, крахмал, лакмусовое молоко, лакмус при этом обесцвечивается. Штамм обладает сильной каталазной активностью и не обладает липазной активностью. Штамм способен расти при 40 °С, 7 % NaCl и 0,001 % лизоцима. В качестве единственного источника углерода штамм использует с образованием кислоты глюкозу, арабинозу, ксилозу, мальтозу, маннит, фруктозу, галактозу, сорбит, крахмал и декстрин; с образованием щелочи – дульцит, рамнозу; гидролизует крахмал, желатину, не гидролизует мочевину; утилизирует цитрат; пропионат не использует. Использует минеральные формы азота – соли аммония и нитраты, аминокислоты и белки. Индол и ацетоин не образует. Штамм непатогенен.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в атмосферном воздухе населенных мест – 5 000 кл/м^3.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнение 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 воздуха производственных помещений 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:

1) Тест на казеиназу включает использование желточного агара и подсчета зон гидролиза (просветления) вокруг выросших колоний через 24—48 ч. 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.

2) 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.

3) Тест устойчивости к NaCl состоит в том, что штамм выращивают на МПА, содержащем 7 % NaCl. Через 24—48 ч вырастают мелкие колонии кремового цвета вяжущей консистенции (диаметр 10—20 мм).

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 х10	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 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 %	
Натрий хлористый	ГОСТ 5963—67

Желточный агар (пептон – 20,0 г, Na_2HPO_4 – 2,5 г, NaCl – 1,0 г, $MgSO_4$ 0,5 % раствор – 1 мл, глюкоза – 1,0 г, агар – 12,5 г, дистиллированная вода – 500 мл, 1 желток с соблюдением правил асептики добавляют ex temporе)

6. Требования безопасности

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

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

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-продуцента.

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 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. 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 ч производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам (прямой метод).

При анализе атмосферного воздуха населенных мест дополнительными функционально-биохимическими методами пробы воздуха отбирают на чашки Петри с плотной селективной питательной средой (желточный агар, МПА+7 % NaCl, МПА+3 % H_2O_2).

Желточный агар. Чашки инкубируют в термостате при 37 °С в течение 24—48 ч и наблюдают зоны гидролиза (просветления) вокруг выросших колоний ***B. subtilis*** Ч-13.

МПА+7 % NaCl. Для выявления устойчивости к NaCl чашки инкубируют в термостате при 37 °С в течение 24—48 ч и наблюдают появление мелких округлых кремоватых колоний тягучей консистенции.

МПА+3 % H_2O_2. Для определения каталазной активности к колониям, выросшим на среде МПА в течение 24—48 ч, 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:

$$К = (П \times 1\,000) \times С \times \tau \quad кл/м^3, \text{ где}$$

К – концентрация штамма *B. subtilis* Ч-13 в воздухе, кл/м^3;

П – количество типичных колоний, выросших на чашке Петри;

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

С – 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 *Bacillus subtilis* Ч-13 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 (Ф.,И.,О., должность, дата, подпись) ____
11. Идентификация штамма и расчёт концентрации произведены (Ф.,И.,О., должность, дата, подпись) _____

Список литературы

1. ГОСТ 17.2.4.02—81 «Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ».

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

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

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

5. Государственная Фармакопея СССР, изд. XI, вып.2. Общие методы анализа.—М., Медицина, – 1990.

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

gost.e-ecolog.ru