Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10291 – продуцента α-амилазы в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания
МУК 4.2.2718—10
МУК 4.2.2721—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 *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10291 – продуцента α-амилазы в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания
МУК 4.2.2718—10
МУК 4.2.2721—10

ББК 51.21
М54

М54 **Метод** микробиологического измерения концентрации клеток *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10291 – продуцента α-амилазы в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—16 с.

ISBN 978—5—7508—0957—8

1. Разработаны ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет (д.б.н. Н. И. Шеина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 10.06.2010 № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 4 августа 2010 г.

4. Введены в действие с 4 октября 2010 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

Редактор Е. В. Николаева
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 21.01.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,0

Тираж 200 экз. Заказ 14

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

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
4 августа 2010 г.
Дата введения: 4 октября 2010 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10291 – продуцента α-амилазы в атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания МУК 4.2.2721—10

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-10291 продуцента α-амилазы в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 5 до 500 000 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 ГОСТ Р 8.563—96 «Методики выполнения измерений».

Методические указания предназначены для применения учреждениями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также лабораториями организаций, аккредитованными 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».

2. Биологическая характеристика *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-10291 и его гигиенический норматив

Штамм *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10291 является продуцентом альфа-амилазы. Получен из штамма *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-5144 с помощью генетических методов, депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов.

Растет на агаризованных средах (МПА, LB-агар и др.) при 36—37 °С в течение 24—36 ч. На LB-агаре колонии достигают максимального диаметра 6—7 см. Колонии округлые, розовато-кремового цвета, края ровные, поверхность колонии матовая, шероховатая, консистенция зернистая. На агаризованной среде с крахмалом штамм дает обильный рост и образование зон гидролиза вокруг колоний, желатин разжижает, восстанавливает лакмусовое молоко.

Устойчив к отдельным бета-лактамным антибиотикам, тетрациклину, полимиксину, рифампицину, сульфометаксозолу.

Клетки представляют собой грамположительные одиночные подвижные палочки размером 0,6—0,8 × 0,2—0,3 мкм, образующие споры, имеющие центральное положение и овальную форму.

Систематическое положение микроорганизма

Класс	*Schizomycetes*
Отряд	*Eubacteriales*
Семейство	*Bacillaceae*
Род	*Bacillus*
Вид	*amyloliquefaciens*
Штамм	ВКПМ В-10291

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

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнения измерений количества клеток микроорганизма в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 5 до 500 000 клеток в 1 м^3 воздуха при доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Прямой метод основан на аспирации из воздуха производственных помещений клеток микроорганизма на среду МПА и подсчете количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам.

Дополнительный физиолого-биохимический метод основан на аспирации из воздуха клеток микроорганизма на поверхность плотной питательной среды (МПБСА), содержащей крахмал, и подсчете зон гидролиза (просветления) вокруг 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.

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
Ареометр-сахарометр с диапазоном измерений 0—10 % с ценой деления 0,1 %	ГОСТ 18481—87
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 246 96—79
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556—81

5.2. Реактивы, растворы

Агар микробиологический	ГОСТ 17206—84
Экстракт солодовый	ГОСТ 418—84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Антибиотики: линкомицин, рифампицин	
Спирт этиловый ректификат	ГОСТ 5962—67
Растворимый крахмал	ГОСТ 10163—76
Агаризованная среда МПА (агар – 1,5—1,8 %, pH 7,5—7,8, режим стерилизации 1,1—1,2 ати в течение 30 мин)	
Среда МПБСА (мясо-пептонный бульон и солодовое сусло 7 °Б в соотношении 1 : 1, растворимый крахмал – 1 %, агар – 2,5 %).	

Для приготовления солодового сусла 7 °Б солодовый экстракт растворяют в дистиллированной воде до 7 % содержания сахара с помощью ареометра.

6. Требования безопасности

При выполнении измерений концентрации клеток штамма-продуцента в воздухе рабочей зоны 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 в нормальных условиях при температуре воздуха (20 ± 5) °С, атмосферном давлении 740—760 мм рт. ст. и влажности воздуха не более 70 %.

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 агаризованной среды. Время аспирации воздуха (5—15 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 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 МПА расплавляют, остужают до 50—60 °С, добавляют свежеприготовленный в стерильной дистиллированной воде раствор антибиотика линкомицина (рифампицина) из расчета 15—20 мкг/мл среды (для 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 с температурой 36—37 °С. Через 24—48 ч производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам (прямой метод).

При микробиологическом анализе воздуха производственных помещений дополнительными функционально-биохимическими методами пробы воздуха отбирают на чашки Петри с МПБСА. Затем чашки инкубируют в термостате при 36—37 °С в течение 24—48 ч и подсчитывают количество зон гидролиза (просветления) вокруг выросших колоний.

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 в 2—3 пассажа во избежание потери им заданных ростовых свойств.

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 зон вокруг колоний продуцента, выросших на чашке;

1 000 – коэффициент пересчета на 1 м^3 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 *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10291
в атмосферном воздухе населенных мест

1. Наименование и адрес испытательной лаборатории (центра), проводящей измерения, аттестат аккредитации лаборатории.
2. Юридический и фактический адрес организации-заказчика.
3. Идентификация используемого метода, методики, ссылки на методы, используемые испытательной лабораторией.
4. Описание состояния объекта исследования.
5. Дата получения объекта измерений и дата проведения анализа.
6. Место отбора пробы.

Результаты микробиологического анализа

Шифр или № пробы	Определяемый микроорганизм	Концентрация, кл./м^3

Ответственный исполнитель:
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