Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток *B. licheniformis* ВКПМ В-9608 – продуцента протеазы в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания
МУК 4.2.2717—10
МУК 4.2.2720—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. licheniformis* ВКПМ В-9608 – продуцента протеазы в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания
МУК 4.2.2717—10
МУК 4.2.2720—10

ББК 51.21
М54

М54 **Метод** микробиологического измерения концентрации клеток *B. licheniformis* ВКПМ В-9608 – продуцента протеазы 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—0956—1

1. Разработаны ГОУ ВОП 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 15

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. licheniformis* ВКПМ В-9608 – продуцента протеазы в атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания МУК 4.2.2720—10

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *B. licheniformis* ВКПМ В-9608 – продуцента протеазы в воздухе рабочей зоны 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 *B. licheniformis* ВКПМ В-9608 и его гигиенический норматив

Штамм *B. licheniformis* ВКПМ В-9608 является продуцентом протеазы. Штамм создан с помощью генетических методов в ГосНИИ генетика и депонирован в ВКПМ.

B. licheniformis ВКПМ В-9608 строгий аэроб, сапрофит, мезофил. На LB-агаре при температуре 36—37 °С штамм дает обильный рост, при этом образуются колонии кремового цвета, неправильной формы, слизистые, тянущиеся за бактериологической петлей, шероховатые, непрозрачные. На 2—3-и сутки по краю колонии появляется светлая кайма, в центре колонии наблюдается складчатая поверхность, максимальный диаметр – 8—10 мм.

На мясопептонном бульоне штамм дает обильный рост клеток, раствор становится мутным, спустя 24 ч роста появляется кремоватый оттенок.

Штамм интенсивно разлагает белковые среды благодаря действию протеолитических энзимов, при этом на желатине происходит разжижение, на среде лакмус-молоко – пощелочение, пептонизация. Устойчив к бета-лактамным антибиотикам, линкомицину и полимиксину, а также некоторым сульфаниламидам (сульфометаксозолу).

Морфологически клетки представляют собой грамположительные одиночные подвижные палочки размером 0,6—0,8 × 0,2—0,3 мкм, образующие споры. В первые часы роста (логарифмическая фаза) образуются цепочки из 2—3 клеток вытянутой формы. К 48—56 ч (стационарная фаза) цепочки распадаются, клетки утолщаются, появляются споры, имеющие центральное положение и овальную форму.

Систематическое положение микроорганизма

Класс	*Schizomycetes*
Отряд	*Eubacteriales*
Семейство	*Bacillaceae*
Род	*Bacillus*
Вид	*licheniformis*
Штамм	ВКПМ В-9608

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в атмосферном воздухе населенных мест – 5 000 кл./м^3, пометка А, 4-й класс опасности.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнения измерений количества клеток микроорганизма в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 5 до 50 000 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 агаризованную среду LB-агар и подсчете количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам.

Косвенный метод основан на аспирации из воздуха клеток микроорганизма на поверхность плотной питательной среды (молочный агар Эйкмана) и подсчете прозрачных зон, образующихся вокруг выросших колоний и четко выделяющихся на общем молочно-мутном фоне среды через 18—24 ч.

При данном методе на одной чашке Петри после забора пробы может быть учтено не более 50 колоний, т. к. большее количество колоний на чашке образует сливающиеся зоны пептонизации молочного белка казеина.

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	
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
Чашки Петри бактериологические плоскодонные, стеклянные, диаметром 100 мм	
Пробирки биологические вместимостью 20 и 35 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 246 96—79
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556—81

5.2. Реактивы, растворы

Полимиксин, левомицетин, нистатин
Спирт этиловый ректификат ГОСТ 5962—67
LB-агар (дрожжевой экстракт 5 г/л, триптон 10 г/л, NaCl 5 г/л, агар 15 г/л, pH 6,8—7,0, режим стерилизации 1,1—1,2 ати в течение 30 мин)
Молочный агар Эйкмана (10 мл среды МПА и 2,5—3,0 мл стерильного молока – содержание жира не более 2 %, белка – 2,8 % – смешать *ex tempore*)

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 агаризованной среды. Время аспирации воздуха (5—15 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 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 LB-агар расплавляют, остужают до 50—60 °С, добавляют свежеприготовленный в стерильной дистиллированной воде раствор полимиксина (или левомицетина) из расчета 10—15 мкг на 1 мл среды (для подавления посторонней бактериальной микрофлоры), раствор нистатина из расчета 10 мкг на 1 мл среды (для подавления грибковой флоры), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

При выполнении анализа воздуха косвенным методом к уже приготовленному МПА добавляют, соблюдая все правила асептики, стерильное молоко из расчета 10 мл агризованной среды и 2,5—3,0 мл молока и разливают по 10 мл в стеклянные чашки Петри на горизонтальной поверхности.

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 37 °С. Через 18—24 ч производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам (прямой метод) или прозрачных зон вокруг выросших колоний продуцента на общем молочно-мутном фоне среды (косвенный метод) как результат ферментативного действия протеазы на молочный белок – казеин.

Ростовые свойства используемой питательной среды 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 используемой среды, термостатируется в термостате при 37 °С и на 2—3-и сутки производится подсчет выросших колоний.

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 *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-9608 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