Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации
Государственные санитарно-эпидемиологические правила и нормативы

4.2.МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Acinetobacter species JN-2 (препарата Дестройл)* в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.2427—08

Издание официальное

Москва
2009

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 *Acinetobacter species JN-2* (препарата Дестройл) в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.2427—08

ББК 51.21
М54

М54 Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Acinetobacter species JN-2* (препарата Дестройл) в воздухе рабочей зоны: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—11 с.

ISBN 978—5—7508—0867—0

1. Разработаны в ФГУН «Новосибирский научно-исследовательский институт гигиены Роспотребнадзора» (к. м. н. В. А. Копанев).

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 3 июля 2008 г. № 2).

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 29 октября 2008 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.21

© **Роспотребнадзор, 2009**
© **Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009**

Содержание

1. Общие положения и область применения 10
2. Характеристика препарата Дестройл 11
3. Физико-химические и биологические показатели препарата Дестройл 11
4. Биологическая характеристика *Acinetobacter species JN-2* 11
5. Пределы измерений 12
6. Метод измерений 12
7. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы 12
8. Требования безопасности 14
9. Требования к квалификации операторов 14
10. Условия измерений 14
11. Проведение измерения 14
12. Вычисление результатов измерения 15
13. Оформление результатов измерений 16
14. Список литературы 16

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
29 октября 2008 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2.МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Acinetobacter species JN-2* (препарата Дестройл) в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.2427—08

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *Acinetobacter species JN-2* (препарата Дестройл) в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 10 до 500 000 клеток в 1 м³ воздуха.

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

Методические указания предназначены для применения в учреждениях Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также в лабораториях других предприятий, организаций и учреждений, аккредитованных 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. Характеристика препарата Дестройл

Бактериальный препарат Дестройл является продуктом микробиологического синтеза на основе культуры *Acinetobacter species JN-2.*

Препарат Дестройл представляет собой тонко измельченный порошок, состоящий из вегетативных клеток культуры-продуцента, остатков питательной среды и метаболитов, стабилизирующих добавок и наполнителей.

Препарат обладает высоко выраженной окислительной активностью в отношении углеводородов нефти и нефтепродуктов, вызывая в них глубокие необратимые процессы деградации до остаточных продуктов, относящихся к экологически нейтральным соединениям.

Дестройл применяют для очистки почвы и воды, кроме водоемов 1-го и 2-го классов водопользования, от загрязнений сырой нефтью и её продуктами.

В воздухе может находиться в виде аэрозоля. Препарат не обладает раздражающим и резорбтивным действиями, кумулятивные свойства выражены слабо ($K_{кум} > 5$).

ПДК в воздухе рабочей зоны – 50 000 м.кл/м^3.

3. Физико-химические и биологические показатели препарата Дестройл

Мелкодисперсный порошок Цвет	от светло-желтого до светло-коричневого.
Фракционный состав	500 мкм – 3,5 %, 150 мкм – 70 %.
Массовая доля влаги (%)	не более 10,0.
Растворимость в воде	0,8—1,1 %.
Степень биохимического окисления нефтепродуктов (%)	не менее 75,0.
Количество жизнеспособных бактериальных клеток в 1 г	не менее $1 \cdot 10^8$.

4. Биологическая характеристика *Acinetobacter species JN-2*

Бактерии – неспоровые, неподвижные, грамотрицательные. Культура представлена очень короткими, толстыми палочками

(коккоидными палочками), преимущественно в парах в молодом возрасте, в стационарной фазе роста – кокками. Средний размер клеток (20 ч, среда Хоттингера) 1,0—1,5 мкм. Двухсуточные колонии, выращенные при 32 °С – круглые, каплевидные, бесцветные, непрозрачные, диаметр – 1—2 мм. Пятисуточные колонии – диаметр 2—3 мм.

Устойчивы к пенициллину.

Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под названием *Acinetobacter species JN.*

5. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений количества клеток микроорганизма в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 10 до 500 000 клеток в 1 м³ воздуха при доверительной вероятности 0,95.

Пределы относительной погрешности при отборе заданного объема воздуха – 25 %.

6. Метод измерений

Определение основано на использовании пробоотборного устройства электрического ПУ-1Б, предназначенного для автоматического отбора проб биологических аэрозолей при проведении санитарного контроля воздуха рабочей зоны.

Устройство обеспечивает отбор проб аэрозолей на плотную питательную среду имплактационным осаждением аэрозольных частиц размером 1,5 мкм.

7. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства и материалы.

7.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы

Устройство пробоотборное ПУ-1Б	
Прибор для бактериологического анализа воздуха, модель 818 (щелевой прибор Кротова)	ТУ 64-12791—77
Прибор для подсчета колоний микроорганизмов	

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 90 мм	ГОСТ 23932—90
Пробирки бактериологические $П_1$ и $П_2$, 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

7.2. Реактивы, растворы

Агар микробиологический	ГОСТ 17206—84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Антибиотик: бензилпенициллина натриевая соль	
Спирт этиловый ректификат	ГОСТ 5962—67
Агаризованная среда МПА (агар – 1,5—1,8 %, pH 7,5—7,8, режим стерилизации 1,1—1,2 ати в течение 30 мин)	

8. Требования безопасности

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

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

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

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

8.4. 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).

8.5. Все виды работ с реактивами проводят только в вытяжном шкафу при работающей вентиляции, работа с биологическим материалом осуществляется в боксе, оборудованном бактерицидными лампами.

9. 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.

10. Условия измерений

Процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят в нормальных условиях при температуре воздуха (20 ± 5) °С, атмосферном давлении 630—800 мм рт. ст. и влажности воздуха не более 80 %.

11. Проведение измерения

11.1. Условия отбора проб воздуха

Для определения концентрации клеток микроорганизма воздух аспирируют при помощи пробоотборника со скоростью 10 л/мин на поверхность плотной питательной агаризованной среды. Время аспирации воздуха (1—10 мин) зависит от предполагаемой концентрации клеток штамма-продуцента.

Аппарат перед каждым отбором пробы воздуха протирают спиртом. Особенно тщательно обрабатывают поверхность подвижного диска и внутреннюю стенку прибора; наружную и внутреннюю стенку крышки. На подвижной диск устанавливают подготов-

ленную чашку Петри со средой, снимают 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. На дне чашки Петри стеклографом отмечают точку контроля, время аспирации и дату отбора пробы.

11.2. Выполнение анализа

При выполнении анализа воздуха прямым методом агаризованную среду МПА расплавляют, остужают до 50—60 °С, добавляют свежеприготовленный в стерильной дистиллированной воде раствор антибиотика бензилпенициллина натриевая соль из расчета 180—210 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 29—31 °С. Через 24 часа производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам (прямой метод).

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.

12. Вычисление результатов измерения

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

$$C = 1\,000 \cdot (P/Q), \text{ где}$$

C – количество микробных клеток в воздухе (кл./м^3),
P – число микробных клеток в отобранной пробе воздуха,
Q – объем отобранной пробы, л.

В случае невозможности использования пробоотборника, 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 установле-

но, что за 5 мин на площадь 100 см² 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 см². Составляя пропорцию, определяем, что за 1 мин на стеклянную чашку Петри оседают клетки из 1,57 л. Количество клеток в 1 м³ воздуха определяем по вышеприведенной формуле, где Q = 1,57 л/мин · t (время аспирации, мин).

Предлагаемый метод является ориентировочным и может быть использован как вспомогательный.

13. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по нижеприведенной форме.

Протокол №_____
количественного микробиологического анализа штамма-продуцента *Acinetobacter species JN (препарат Дестройл) в воздухе рабочей зоны*

1. Дата проведения анализа_____
2. Место отбора пробы _____
3. Название лаборатории_____
4. Юридический адрес организации_____

Результаты микробиологического анализа

Шифр или № пробы	Определяемый микроорганизм	Концентрация, кл./м³

Ответственный исполнитель_____

Научный руководитель _____

14. 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. 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.

gost.e-ecolog.ru