Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток штамма-продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger ВКПМ F-171* в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.2656—10

Издание официальное

Москва • 2010

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 штамма-продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger ВКПМ F-171* в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.2656—10

ББК 51.21
М54

М54 **Метод** микробиологического измерения концентрации клеток штамма-продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger ВКПМ F-171* в воздухе рабочей зоны: Методические указания.— М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—11 с.

1. Разработаны Государственным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И. И. Мечникова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (д.м.н. В. Г. Маймулов, д.м.н. И. Ш. Якубова, д.м.н. Т. С. Чернякина), Государственным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом пищевых ароматизаторов, кислот и красителей Российской академии сельскохозяйственных наук (ГУ ВНИИПАКК РАСХН) (к.б.н. Н. Ю. Шарова, д.т.н. Т. А. Никифорова, к.т.н. Д. Х. Кулев, О. А. Ходкевич).

2. Рекомендованы Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 9 июля 2010 г.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

© Роспотребнадзор, 2010
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010

Содержание

1. Общие положения и область применения 4
2. Биологическая характеристика штамма-продуцента *Aspergillus niger ВКПМ F-171* и его гигиенический норматив 5
3. Пределы измерений 6
4. Метод измерений 6
5. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы 6
5.1. Средства измерений, вспомогательные устройства 7
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 9
10. Вычисление результатов измерения 10
11. Оформление результатов измерений 10
Список литературы 11

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

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток штамма-продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger ВКПМ F-171* в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.2.2656—10

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма-продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger ВКПМ F-171*, селекционированного в ГУ ВНИИ пищевых ароматизаторов, кислот и красителей РАСХН (ГУ ВНИИПАКК), в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 100 до 5 000 клеток в 1 $м^3$ воздуха.

Методические указания разработаны с целью обеспечения микробиологического контроля концентрации конидий штамма *Aspergillus niger ВКПМ F-171* в воздухе производственных помещений биотехнологического производства лимонной кислоты и оценки соответствия уровня их содержания гигиеническим нормативам на основе учета требований ГОСТ 12.1.005—88 «ССБТ. Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования», ГОСТ Р 8.563—96 «Методики выполнения измерений» и Р 2.2.2006—05 «Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда».

Методические указания предназначены для применения в лабораториях организаций, аккредитованных в установленном порядке на право проведения микробиологических исследований.

2. Биологическая характеристика штамма-продуцента *Aspergillus niger ВКПМ F-171* и его гигиенический норматив

Продуцент лимонной кислоты *Aspergillus niger ВКПМ F-171* относится к микромицетам. Уже на 2-е сутки на поверхности среды Чапека или сусло-агара при температуре 32 °С клетки (кл.) образуют округлые колонии диаметром 2,0 см с плоским субстратным мицелием, аспорогенные. На 5-е сутки роста они достигают максимального диаметра в среднем 8,1 см на среде Чапека и 8,6 см – на сусло-агаре. Окраска гигантской колонии бежевая – на среде Чапека, светло-бежевая – на сусло-агаре. Воздушный мицелий сильно развит: от поверхности субстратного мицелия вертикально поднимаются несептированные клетки – конидиеносцы. Минимальная длина конидиеносца 48 мкм, максимальная – 1 265 мкм. Диаметр поперечного сечения конидиеносца – от 9 до 20 мкм. Верхний конец конидиеносца расширяется, образуя вздутие – пузырек диаметром от 20 до 60 мкм. От поверхности пузырька синхронно образуются цилиндрические выросты – стеригмы двуслойной структуры. От каждой стеригмы первого слоя отделяются в основном две вторичные стеригмы. Стеригмы первого слоя вдвое крупнее, чем стеригмы второго слоя. Длина стеригм первого слоя – от 6 до 32 мкм, второго слоя – от 5 до 10 мкм. Стеригмы второго слоя образуют цепочки конидий, созревание которых начинается на вторые сутки. Конидии имеют шарообразную форму, диаметр – 4,1 мкм, толстую пигментированную оболочку с шипами. Вздутие конидиеносца, стеригмы и конидии являются составляющими конидиальной головки, диаметр сечения которой колеблется от 44 до 132 мкм. В центре колонии конидиальные головки расположены плотно. От центра к краю колонии конидиальные головки мельче. По краю колонии в радиусе 0,5 см – на среде Чапека и 0,6 см – на сусло-агаре наблюдается светлая зона с незрелыми белыми конидиальными головками, плотно прижатыми к субстратному мицелию. Обратная сторона колонии гладкая, белая.

Систематическое положение микроорганизма

Царство	*Fungi*
Подцарство	*Neomycota*
Отдел	*Ascomycota*
Подотдел	*Euascomycotina*
Класс	*Plectomycetes*
Порядок	*Hyphomycetales*
Род	*Aspergillus*
Вид	*Niger*
Штамм	*ВКПМ F-171, ГУ ВНИИПАКК*

Штамм *Aspergillus niger ВКПМ F-171* получен в ГУ ВНИИПАКК методом мутагенеза из штамма *Aspergillus niger Л-1* с использованием химических мутагенов и УФ-облучения в сочетании с отбором спонтанных вариантов и депонирован в ВКПМ как продуцент лимонной кислоты.

Штамм растет на жидких агаризованных средах. Оптимальная температура – от 28 до 32 °С. Для размножения используется сусло-агар (значение Баллинга 7°).

Предельно допустимая концентрация *Aspergillus niger ВКПМ F-171* в воздухе рабочей зоны – 1×10^3 кл./м^3, пометка А, класс опасности 3.

3. Пределы измерений

Методика позволяет выполнить измерения количества клеток продуцента лимонной кислоты в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 100 до 5 000 клеток в 1 м^3.

4. Метод измерений

Метод измерения концентрации конидий штамма-продуцента *Aspergillus niger ВКПМ F-171* основан на аспирации из воздуха конидий микромицета на поверхность среды Чапека или сусло-агар, подсчета выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам на 2-е сутки роста и контроля их развития на 5-е сутки роста.

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы

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

5.1. Средства измерений, вспомогательные устройства

Импактор воздуха микробиологический «Флора-100»	ТУ 64-098-33—95
Термостаты электрические суховоздушные типа ТС	ТУ 64-1-1382—76
Автоклав электрический	
Бокс, оборудованный бактерицидными лампами	
Холодильник бытовой	ГОСТ 16317—87
Весы лабораторные аналитические ВЛА-200-М	
Чашки Петри бактериологические плоскодонные, стеклянные, диаметром 100 мм	ГОСТ 25336—82
Колбы конические	ГОСТ 25336—82
Микроскоп биологический с иммерсионной системой типа МБИ-15	ГОСТ 25706—83
Термометр	
Прибор для определения влажности воздуха	

5.2. Реактивы, растворы

Среда Чапека (или сухой бакто-агар Czapek)	ТУ 9229-014-00419789—95 (или импортного производства)
Среда сусло-агар с массовой концентрацией лимонной кислоты 1,0 %	ГОСТ 10444.1—84
Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья	ГОСТ Р 51652—2000

6. Требования безопасности

При выполнении измерений концентрации конидий продуцента *Aspergillus niger ВКПМ F-171* в воздухе рабочей зоны соблюдают:

- правила техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.005—88;
- правила электробезопасности при работе с электроустановками в соответствии с ГОСТ 12.1.019—79 и инструкциями по эксплуатации приборов;
- требования, изложенные в руководстве «Положение об организации работы по технике безопасности в микробиологической промышленности» (1980);

• положения инструкции по устройству, требованиям безопасности и личной гигиены при работе в микробиологических лабораториях предприятий микробиологической промышленности (1977);

• санитарные правила по работе с микроорганизмами СП 1.3.2322—08;

• требования безопасности при работе с продуцентом лимонной кислоты, изложенные в инструкции по контролю производства лимонной кислоты (1997).

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

Измерение концентрации конидий штамма-продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger ВКПМ F-171* в воздухе рабочей зоны проводят с помощью прибора «Фора-100» при температуре окружающей среды от 0 до 50 °С и относительной влажности воздуха не более 80 %.

9. Проведение измерения

9.1. Условия отбора проб воздуха

Определение концентрации конидий микромицета *Aspergillus niger ВКПМ F-171* в воздухе производственных помещений проводят в результате их аспирации на плотную питательную среду Чапека или сусло-агар с последующей инкубацией в термостате и подсчетом выросших колоний по типичным морфологическим признакам.

Воздух аспирируют с помощью импактора «Флора-100» в автоматическом режиме со скоростью 10 дм^3/мин на поверхность среды Чапека или сусло-агара на чашки Петри. Линейная скорость анализируемого воздуха автоматически поддерживается на уровне, позволяющем осаждать с 50 % эффективностью частицы диаметром не менее 1,4 мкм (D_{50}). Контроль параметров (заданный отбираемый объем воздуха, текущий отобранный объем) осуществляется методом индикации.

Аспирацию воздуха проводят с интервалом 2 мин и отбирают по 5 проб (через 2, 4, 6, 8 и 10 мин) в каждой точке контроля. Выбор точек контроля определяется в соответствии с МУК 4.2.734—99.

Отбор проб сопровождается составлением акта отбора с указанием места, времени и условий отбора по форме:

Акт
отбора проб

1. Дата, Ф.,И.,О. работающего (рабочее место) _____
2. Профессия _____
3. Предприятие (лаборатория, подразделение) _____
4. Участок (технологическая стадия, операция) _____
5. Место отбора (наименование рабочей зоны) _____
6. Прибор для отбора проб _____
7. Количество проб и точка их отбора _____
8. Условия отбора проб (объем прокаченного воздуха и время аспирации) _____
9. Дата последней метрологической поверки оборудования для отбора проб _____
10. Микроорганизм, содержание которого контролируется (род, вид, штамм) _____
11. Питательная среда, оптимум роста, время инкубации _____

Ответственный исполнитель
Руководитель (технологического участка, лаборатории, подразделения)

9.2. Выполнение анализа

Агаризованную среду Чапека (сухой бакто-агар Czapek готовят согласно документации фирмы-производителя) или сусло-агар расплавляют, остужают до 50—60 °С и разливают в стерильные чашки Петри по 20 $см^3$. Чашки с застывшей средой помещают в термостат при температуре 37 °С на сутки, после чего проросшие чашки бракуют.

После отбора проб воздуха на чашки Петри их помещают в термостат при температуре 32 °С на 48 ч, по истечении которых производят подсчет выросших типичных колоний продуцента. Микроскопирование культуры проводят с помощью микроскопа биологического с иммерсионной системой типа МБИ-15 в следующих условиях: объектив – планапохроматический; увеличение – 40,0 × 0,65; система – сухая; поле зре-

ния с окуляром 10^x в плоскости объекта 1,14 мм; рекомендуемый окуляр – К-6,3^x.

10. Вычисление результатов измерения

Расчет концентрации микробных клеток *Aspergillus niger ВКПМ F-171* в 1 м^3 воздуха выполняют на основании 5 проб, полученных при разном времени аспирации (через 2, 4, 6, 8 и 10 мин) в каждой точке контроля, и производят по формуле:

$$K = \frac{П \cdot 1\,000}{C \cdot t}, \text{ где}$$

K – концентрация клеток продуцента в воздухе, кл./м^3;
$П$ – количество колоний продуцента, выросших на чашке Петри;
1 000 – коэффициент пересчета 1 дм^3 в 1 м^3 воздуха;
C – скорость аспирации, дм^3/мин;
t – время аспирации, мин.

11. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по форме.

Протокол №
количественного микробиологического анализа штамма-продуцента Aspergillus niger ВКПМ F-171 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./м^3

Ответственный исполнитель _____

Список литературы

1. ГОСТ 12.1.005—88 «ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны». М.: Стандартинформ, 1988. 49 с.

2. ГОСТ Р 8.563—96. «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений». М.: Госстандарт России, 1997. 19 с.

3. Р 2.2.2006—05 «Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда». М.: Госстандарт России, 2005. 40 с.

4. Положение об организации работы по технике безопасности в микробиологической промышленности. М., 1980. 27 с.

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

6. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитных болезней». М.: Минздрав России, 2008. 19 с.

7. ИК 01-00334557—97 «Инструкция по биологическому и химическому контролю производства пищевой лимонной кислоты». СПб.: ВНИИПАКК, 1997. 268 с.

Метод микробиологического измерения концентрации клеток штамма-продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger ВКПМ F-171* в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.2656—10

Редакторы Н. В. Кожока, Е. В. Николаева
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 21.10.10

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75
Тираж 100 экз. Заказ 81

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