Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Микробиологическое измерение концентрации клеток и спор микроорганизмов в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе

Сборник методических указаний
МУК 4.2.2233—4.2.2239—07

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

Микробиологическое измерение концентрации клеток и спор микроорганизмов в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе

Сборник методических указаний
МУК 4.2.2233—4.2.2239—07

ББК 51.21
М59

М59 **Микробиологическое** измерение концентрации клеток и спор микроорганизмов в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе: Сборник методических указаний.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—63 с.

ISBN 978—5—7508—0822—9

1. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 29 марта 2007 г. № 1).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 6 августа 2007 г.

ББК 51.21

ISBN 978—5—7508—0822—9

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

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Микробиологическое измерение концентрации клеток *Bacillus licheniformis 103* – продуцента α-амилазы в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.2237—07

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

2. Введены в действие с 1 октября 2007 г.

3. Введены впервые.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
6 августа 2007 г.
Дата введения: 1 октября 2007 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Микробиологическое измерение концентрации клеток *Bacillus licheniformis 103* – продуцента α-амилазы в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.2.2237—07

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *B. licheniformis 103* – продуцента α-амилазы в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 до 500 000 клеток в 1 $м^3$ воздуха.

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005—88 «ССБТ. Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования» и ГОСТ Р 8.563—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. Биологическая характеристика *B. licheniformis 103* и его гигиенический норматив

Штамм *Bacillus licheniformis 103* продуцирует фермент α-амилазу.

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-му ч (стационарная фаза) цепочки распадаются, клетки утолщаются, появляются споры, имеющие центральное положение и овальную форму.

При выращивании на мясопептонном агаре (МПА) в течение 24—48 ч штамм дает обильный рост, колонии неправильной формы с приподнятым центром, слизистые, гладкие, непрозрачные, максимальный диаметр – 13 мм, в начале роста кремового цвета, затем постепенно розовеющие.

На мясопептонном бульоне штамм дает обильный рост клеток, раствор становится мутным, к 24-му ч роста появляется кремовато-розовый оттенок.

На агаризованной среде с крахмалом штамм дает обильный рост и образование зон гидролиза вокруг колоний. Колонии неправильной формы, слизистые, гладкие, непрозрачные, с приподнятым центром. К 72-му ч роста колонии имеют коричневато-бордовый цвет.

Оптимальная температура роста – 40—42 °С, оптимум pH – 7,5—7,8. Желатин разжижает, крахмал гидролизует. Восстанавливает лакмусовое молоко. Нитраты восстанавливает до нитритов, каталазоположительный, образует сероводород, вызывает гемолиз.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воздухе рабочей зоны – 50 000 кл./м^3, пометка А.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений количества клеток микроорганизма в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 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 подсчета количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам.

Дополнительный физиолого-биохимический метод основан на аспирации из воздуха клеток микроорганизма на поверхность плотной питательной среды, содержащей крахмал, и подсчета 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	
Термостаты электрические суховоздушные или водяные	
Автоклав электрический	ГОСТ 9586—75
Бокс, оборудованный бактерицидными лампами	
Холодильник бытовой	
Ареометр-сахарометр с диапазоном измерений 0—10 % с ценой деления 0,1 %	ГОСТ 18481—87
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 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—84
Экстракт солодовый	ГОСТ 418—84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Антибиотики: ампициллина натриевая соль	
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 требования:

- санитарных правил СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами»;
- правил техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.005—88;
- правил электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019—79 и инструкции по эксплуатации прибора;
- руководства «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).

Все виды работ с реактивами проводят только в вытяжном шкафу при работающей вентиляции, работа с биологическим материалом осуществляется в боксе, оборудованным 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 630—800 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 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 тщательно протирают спиртом. Особенно тщательно обрабатывают поверхность подвижного диска и внутреннюю стенку прибора, наружную и внутреннюю стенку крышки. На подвижный 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 ампициллина из расчета 120—150 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 40—42 °С. Через 24—48 ч проводят 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 40—42 °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.

10. Вычисление результатов измерения

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

$$X = \frac{N \times 1\,000}{V}, \text{ где}$$

X – концентрация клеток продуцента в воздухе, кл./м^3;

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).

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 установлено, что за 5 мин на площадь 100 см^2 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 см^2. Составляя пропорцию, определяем, что за 1 мин на стеклянную чашку Петри оседают клетки из 1,57 л. Количество клеток в 1 м^3 воздуха определяем по вышеприведенной формуле, где $V = 1{,}57$ л/мин $\times$ t (время аспирации, мин).

Предлагаемый метод является ориентировочным и может быть использован как вспомогательный метод.

11. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по приведенной форме.

Протокол №

количественного микробиологического анализа
штамма-продуцента *Bacillus licheniformis 103* 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:
Научный руководитель:

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.

Содержание

Микробиологическое измерение концентрации клеток и спор *Bacillus subtilis 24Д* – действующего вещества микробиологического фунгицида «Интеграл» в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.2233—07 3

Микробиологическое измерение концентрации клеток плесневого гриба *Penicillium canescens PlPh33* – продуцента пектинлиазы и фитазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.2234—07 13

Микробиологическое измерение концентрации клеток плесневого гриба *Penicillium canescens PlPh33* – продуцента пектинлиазы и фитазы в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.2235—07 21

Микробиологическое измерение концентрации клеток *Bacillus licheniformis 103* – продуцента α-амилазы в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.2236—07 29

Микробиологическое измерение концентрации клеток *Bacillus licheniformis 103* – продуцента α-амилазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.2237—07 37

Микробиологическое измерение концентрации клеток микроорганизма *Penicillium canescens F-912* – продуцента β-ксиланазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.2238—07 47

Микробиологическое измерение концентрации клеток микроорганизма *Penicillium canescens F-912* – продуцента β-ксиланазы в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.2239—07 55

Микробиологическое измерение концентрации клеток и спор микроорганизмов в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе

Сборник методических указаний
МУК 4.2.2233—4.2.2239—07

Редакторы Л. С. Кучурова, Е. В. Николаева
Технический редактор А. В. Терентьева

Подписано в печать 1.02.10

Формат 60x88/16 Печ. л. 4,0
Тираж 200 экз. Заказ 5

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