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 плесневого гриба *Penicillium canescens PlPh33* – продуцента пектинлиазы и фитазы в атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания
МУК 4.2.2235—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 плесневого гриба *Penicillium canescens PlPh33* – продуцента пектинлиазы и фитазы в атмосферном воздухе населенных мест

Методические указания МУК 4.2.2235—07

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *P. canescens PlPh33* – продуцента пектинлиазы и фитазы в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 50 до 5 000 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 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 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 *P. canescens PlPh33* и его гигиенический норматив

Штамм мицелиального гриба *Penicillium canescens PlPh33* является продуцентом пектинлиазы и фитазы. Получен из штамма *Penicillium canescens* ВКПМ F-178 путем селекции. Депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г. К. Скрябина РАН под номером ВКМ F-3867D.

Растет на агаризованных средах (среда Чапека с дрожжевым автолизатом, сусло-агар, Мальц-агар, глюкозо-картофельный агар) при температуре 25—28 °С в течение 5—7 сут., pH 5,0—6,0. При температуре 5 и 37 °С роста колоний не наблюдается.

На среде Чапека с дрожжевым автолизатом и сусло-агаре колонии достигают максимального диаметра 5—6 см. Колонии радиально складчатые, средней плотности, ростовая зона плотная. Мицелий белый, конидиальная зона голубовато-серебристая, конидиогенез обильный. Обратная сторона палевая, буроватая, со временем темно-коричневая.

При микроскопическом исследовании конидиеносцы двухъярусные, терминальные, фуркатные, шероховатые, длиной 150 мкм, шириной 3—4 мкм. Метулы шероховатые, размером 10—18 × 2,5—3,5 мкм, фиалиды ампулиформные, размером 7—8 × 2—3 мкм, конидии чаще округлые, гладкие, размером 2,2—3,0 × 2,0—3,0 мкм.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в атмосферном воздухе населенных мест – 200 кл./м^3, пометка А.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений количества клеток плесневого гриба в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 10 до 5 000 клеток в 1 м^3 воздуха при доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Метод основан на аспирации из воздуха клеток плесневого гриба на поверхность агаризованной среды и подсчета выросших колоний по типичным культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам на 3-и сут.

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 MAS – 100 ECO фирмы Merk (Германия) для отбора проб воздуха	
Прибор для бактериологического анализа воздуха, модель 818 (щелевой прибор Кротова)	ТУ 64-12791—77
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 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 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
Пектин	ГОСТ Р 51806—2001
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Спирт этиловый ректификат	ГОСТ 5962—67
Кислота молочная пищевая (для подкисления среды и подавления посторонней бактериальной флоры)	ГОСТ 490—79

Среда сусло-агар: солодовое сусло 7°Б – 98 %, агар-агар – 2 %, pH среды 4,5—5,0, режим стерилизации: Р – 0,8 кгс/см^2, 40 мин. Для приготовления солодового сусла 7°Б солодовый экстракт растворяют в дистиллированной воде до 7 %-го 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;
- «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, 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 630—800 мм рт. ст. и влажности воздуха не более 80 %.

9. Проведение измерения

9.1. Условия отбора проб воздуха

Для определения концентрации клеток плесневого гриба воздух аспирируют при помощи пробоотборника со скоростью 10 л/мин на поверхность агаризованной среды. Время аспирации воздуха (5—20 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

Метод предполагает учет количества типичных колоний, выросших на 3-и сут. после посева проб воздуха по культурально-морфологическим признакам. Прямой метод позволяет учитывать на чашке до 200 колоний продуцента.

Агаризованную среду сусло-агар расплавляют, остужают до 50—60 °С, добавляют молочную кислоту из расчета 2 мл на 0,5 л среды (для подкисления среды и подавления посторонней бактериальной микрофлоры, pH 5,0—6,0), тщательно перемешивают 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 при температуре 28 °С. Через 3—4 сут. проводят подсчет выросших типичных по морфологическим признакам колоний продуцента. При необходимости культуру подвергают микроскопированию.

При микробиологическом анализе воздуха производственных помещений дополнительным функциональным методом является отбор пробы воздуха на чашки Петри с агаризованной средой. После отбора проб чашки покрывают слоем 2 %-го водного пектина толщиной 0,5 см. Затем инкубируют в термостате при 28 °С в течение 48—72 ч и подсчитывают количество зон осветления и разложения пектина 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 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 приведенной форме.

Протокол №
количественного микробиологического анализа штамма-продуцента *P. canescens PlPh33* в атмосферном воздухе населенных мест

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. 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.
6. Бабьева И. П., Зенова Г. М. Биология почв. М.: МГУ. С. 122.

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