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 и спор *Bacillus subtilis 24Д* – действующего вещества микробиологического фунгицида «Интеграл» в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.2233—07

1. Разработаны ОАО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» (д.б.н. В. И. Бобров, к.б.н. С. Н. Птицина, к.б.н. М. М. Борисов, И. Х. Иванова).

2. Введены в действие с 1 октября 2007 г.

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 и спор *Bacillus subtilis 24Д* – действующего вещества микробиологического фунгицида «Интеграл» в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.2233—07

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток и спор штамма *Bacillus subtilis 24Д* в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций 10—50 000 клеток в 1 $м^3$ воздуха.

Методические указания разработаны с целью обеспечения микробиологического контроля штамма *Bacillus subtilis 24Д* в воздухе производственных помещений биотехнологического цеха и оценки соответствия уровня его содержания гигиеническим нормативам на основе учета требований ГОСТ 12.1.005—88 «ССБТ. Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования» и ГОСТ 8.563—96 ГСИ «Методики выполнения измерений».

2. Биологическая характеристика штамма *Bacillus subtilis 24Д*

Штамм *Bacillus subtilis 24Д* (ВНИИСХМ 129) является действующим веществом микробиологического фунгицида «Интеграл». Выделен из растений хлопчатника. Идентифицирован в Институте микробиологии и вирусологии НАН Украины.

Штамм *Bacillus subtilis 24Д* характеризуется следующими культурально-морфологическими и биохимическими свойствами: грамположительные аэробные спорообразующие палочки, продуцирующие каталазу. На МПА, сусло-агаре, среде Громыко и картофельном агаре культура растет обильно. На МПА образует складчатые колонии вязкой консистенции, телесного цвета, края колонии неправильной формы. На картофельном агаре – колонии светло-телесного цвета, блестящие, вязкой консистенции, края ровные. На сусло-агаре и среде Громыко – колонии телесного цвета, складчатые с возвышающимся центром, края – изрезанные, консистенция – вязкая.

В мазках 18-часовой культуры обнаруживаются прямые палочковидные клетки размером 1,9 × 0,5 мкм, расположенные одиночно, реже цепочкой. При спорообразовании клетка не раздувается. Споры эллипсовидные – 0,9 × 0,5 мкм, в клетке расположены центрально.

Штамм *Bacillus subtilis 24Д* ферментирует глюкозу, лактозу, арабинозу, ксилозу, мальтозу, маннит, сахарозу с образованием кислоты; не разлагает дульцит, рамнозу; дает положительную реакцию Фогес-Проскауэра, гидролизует крахмал, желатин, не гидролизует мочевину; утилизирует цитрат; пропионат не использует. Не растет в анаэробных условиях, не образует включения поли-β-оксимасляной кислоты на МПА с глюкозой; не обладает летициназной активностью; индол и сероводород не образует. Штамм не патогенен.

Штамм *Bacillus subtilis 24Д* проявляет антагонистическую активность в отношении фитопатогенных грибов классов фикомицеты, базидиомицеты класса несовершенных грибов, бактерий родов *Erwinia*, *Pseudomonas* и *Xanthomonas*.

Штамм *Bacillus subtilis 24Д* размножают и хранят на МПА, сусло-агаре, среде Громыко, картофельном агаре. Рост при температуре 32—34 °С в течение 24 ч.

Для обнаружения штамма применяют посев проб на агаризованные питательные среды с последующим тестированием культуры по типичным морфологическим признакам.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений количества клеток и спор штамма *Bacillus subtilis 24Д* в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 10 до 50 000 клеток в 1 $м^3$ воздуха при доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Метод измерения концентрации основан на аспирации микробных клеток и спор штамма *Bacillus subtilis 24Д* из воздуха на поверхность плотной питательной среды и подсчете выросших колоний по типичным морфологическим признакам.

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

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

*5.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы**

Прибор для бактериологического анализа воздуха, модель 818 (щелевой прибор Кротова)	ТУ 64-12791—77
Термостат электрический суховоздушный	ГОСТ 9586—75
Автоклав электрический	
Бокс, оборудованный бактерицидными лампами	
Холодильник бытовой	
Весы лабораторные аналитические, типа ВЛА-200	
Микроскоп биологический с иммерсионной системой типа «Биолам» Л-211	
Водяная баня или водяной термостат	
Ареометр-сахарометр АСТ 5-15	
pH-метр	
Газовая горелка или спиртовка лабораторная	

* Допускается использование аналогичных средств измерений и вспомогательных устройств с техническими характеристиками не ниже, чем у указанных в п. 5.1 данной методики и разрешённых к применению в соответствии с утвержденными в установленном порядке методическими указаниями по методам контроля.

Чашки Петри плоскодонные стеклянные, диаметром 10 мм	ГОСТ 25336—92
Петли бактериологические	
Пробирки биологические, вместимостью 20 и 35 мл	ГОСТ 29227—91
Пипетки мерные на 1, 5 и 10 мл	ГОСТ 29227—91
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, питательные среды и их компоненты**

Агар микробиологический	ГОСТ 17206—96
Концентрат сусла пивного неохмеленного	ТУ10-04.06.114—88
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Натрия гидроокись, ч	ГОСТ 4328—77
Амфотерицин В	ФС 42-2051—99
Мясо-пептонный бульон	ГОСТ 20730—75

6. Требования безопасности

При выполнении измерений концентрации клеток и спор штамма *Bacillus subtilis 24Д* 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).

---

* Допускается использование питательных сред и их компонентов, изготовленных по другой нормативной документации, при условии аналогичного состава и качественных показателей не ниже, чем у указанных в п. 5.2 данной методики.

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 оператора

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. Проведение измерения

8.1. Условия отбора проб воздуха

Для определения концентрации микроорганизма производят отбор проб воздуха при помощи аппарата Кротова (п. 5, примечание 1) со скоростью 10 л/мин на поверхность плотной питательной среды. Время отбора одной пробы воздуха 20 мин. Аппарат Кротова 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. В период отбора пробы воздуха крышку чашки Петри хранят в стерильном пакете из бумаги, полиэтилена или другой стерильной емкости.

Отбор проб сопровождается составлением акта отбора пробы с указанием места, времени и условий отбора.

8.2. Выполнение анализа

Метод предполагает учет количества типичных по морфологическим признакам колоний, выросших на 3—4-е сут. после посева воздуха. Прямой метод позволяет учитывать на чашке до 200 колоний.

Подготавливают питательную среду: сусло-агар или среду Громыко. Сусло-агар готовят по общепринятой методике из концентрата сусла пивного неохмеленного (п. 5.2) путем разбавления его дистиллированной водой до общей концентрации сахаров 10 % (10° Баллинга), pH 7,0—

7,2 (при необходимости pH доводят до необходимого значения путем добавления 10 %-го раствора гидроокиси натрия) с добавлением 2,0—2,5 % агар-агара. Среду Громыко готовят по общепринятой методике из мясо-пептонного бульона и сусла пивного неохмеленного с концентрацией сахаров 7 % (7° Баллинга), взятых в соотношении 1 : 1, с добавлением 2,0—2,5 % агар-агара, pH-среды 7,0—7,2. Общую концентрацию сахаров в сусле определяют по ареометру.

Подготовленную среду расплавляют на водяной бане, остужают до 50—60 °С и добавляют в нее раствор амфотерицина В в стерильной дистиллированной воде из расчета 10 мкг амфотерицина В на 1 мл питательной среды для подавления посторонней воздушной микофлоры.

У каждой партии подготовленной питательной среды проверяют ростовые свойства. Используемые питательные среды должны обеспечивать рост микроорганизмов *Bacillus subtilis 24Д* при посеве их в количестве менее 100 жизнеспособных клеток не позднее 24 ч при температуре 32—34 °С.

Готовую питательную среду тщательно перемешивают и разливают по 20 мл в стерильные чашки Петри, установленные на горизонтальной поверхности. Чашки с застывшей средой помещают в термостат на сутки при температуре 30—35 °С, после чего проросшие чашки бракуют, стерильные чашки используют для контроля воздуха.

Культивирование проб воздуха, отобранных согласно п. 8.1, ведут в течение 24 ч при температуре 32—34 °С с последующим учетом выросших типичных колоний штамма *Bacillus subtilis 24Д*. При необходимости выросшую культуру подвергают микроскопической идентификации (окраска мазков – по Граму).

9. Вычисление результатов измерения

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

$$K = (П \times 1\,000) \times C \times T, \text{ где}$$

K – концентрация штамма *Bacillus subtilis 24Д* в воздухе, кл./м^3;

$П$ – количество типичных колоний, выросших на чашке Петри;

1 000 – коэффициент перерасчета на 1 м^3 воздуха;

C – скорость аспирации воздуха, л/мин;

T – время аспирации, мин.

10. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по приведенной форме.

Протокол №
оценки содержания микроорганизма *Bacillus subtilis 24Д*
в воздухе рабочей зоны

1. Дата проведения анализа _____
2. Рабочее место (профессия работающего)_____
3. Место отбора пробы (название и адрес организации, производство, технологическая стадия, точка отбора пробы) _____
_____
4. Вид пробоотборника_____
5. Дата последней метрологической поверки оборудования для отбора проб _____
6. Питательная среда, время инкубации _____
7. Количественная и качественная характеристика выросших колоний (количество типичных колоний, морфологические признаки, окраска по Граму)_____
8. Результаты идентификации микроорганизмов с указанием метода
_____
9. Результаты расчета концентрации *Bacillus subtilis 24Д*_____
_____
10. Соотношение полученных результатов с уровнем $ПДК_{р.з.}$_____
_____
11. Отбор пробы проведён (Ф., И., О., должность, дата, подпись) __
_____
12. Идентификация штамма и расчёт концентрации проведены (Ф., И., О., должность, дата, подпись) _____

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

5. Государственная фармакопея СССР, изд. XI, вып. 2. Общие методы анализа. М.: Медицина, 1990.

6. Р 2.2.2006—05 «Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда».

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