Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

Государственные санитарно-эпидемиологические
правила и гигиенические нормативы

2.2.6. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ

Предельно допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в воздухе рабочей зоны

Гигиенические нормативы
ГН 2.1.6.1762—03

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методические указания
МУК 4.2.1776—03
МУК 4.2.1777—03
МУК 4.2.1778—03
МУК 4.2.1779—03
МУК 4.2.1780—03
МУК 4.2.1781—03
МУК 4.2.1782—03
МУК 4.2.1783—03
МУК 4.2.1784—03

Издание официальное

Минздрав России
Москва 2004

gost.e-ecolog.ru

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методические указания
МУК 4.2.1776–03
МУК 4.2.1777–03
МУК 4.2.1778–03
МУК 4.2.1779–03
МУК 4.2.1780–03
МУК 4.2.1781–03
МУК 4.2.1782–03
МУК 4.2.1783–03
МУК 4.2.1784–03

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
24 октября 2003 г.
Дата введения: 1 декабря 2003 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Trichoderma viride* 44-11-62/3 – продуцента комплекса целлюлолитических ферментов в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.2.1784—03

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма – *Trichoderma viride* 44-11-62/3 продуцента комплекса целлюлолитических ферментов (целлюлаза, ксиланаза) в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 100 до 5 000 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 Р 8.563—96 «Методики выполнения измерений».

Методические указания предназначены для применения 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. Характеристика штамма-продуцента *Trichoderma viride* 44-11-62/3

На агаризованной среде сусло-агар (содержание солодового сусла 5—6° по Баллингу) на 5 день развития микроорганизм образует характерные колонии до 5—5,5 см в диаметре с гладкой подошвой, слегка приподнятые над поверхностью среды, не врастающие в агар, с волнистым краем, пушистым воздушным мицелием, который покрыт спорами лимонно-желтого цвета. На 3 день развития в среду выделяется ярко-желтый пигмент лимонного оттенка. Гифы мицелия бесцветные, септированные, многократно ветвистые.

Систематическое положение микроорганизма.

Класс	*Fungi imperfecti*
Порядок	*Hyphomycetales*
Род	*Trichoderma*
Вид	*viride*
Штамм	44-11-62/3

Штамм *Trichoderma viride* 44-11-62/3 получен во ВНИИбиотехнология в лаборатории Биосинтеза ферментов методом индуцированной селекции с применением этиленимина и нитрозометилмочевины из исходной культуры *Trichoderma viride* 44 – продуцента целлюлазы и депонирован в ЦМПМ ВНИИгенетика.

Штамм-продуцент синтезирует высокоактивный комплекс целлюлолитических ферментов для производства ферментного препарата целловиридин Г3х. Максимальная активность целлюлазы составляет 35 ед./мл, ксиланазы – 42 ед./мл.

Штамм-продуцент растет на жидких и агаризованных средах. Культивирование гриба происходит 5 суток при температуре 36—38 °С, затем 5 суток при комнатной температуре. Для размножения и хранения используется сусло-агар 5—6 °Б. pH среды – 5,0—6,0.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воздухе рабочей зоны – 2 000 кл./м^3, А.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений количества клеток штамма-продуцента в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 100 до 5 000 клеток в 1 м^3 воздуха при доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Прямой метод измерения концентрации штамма-продуцента основан на аспирации из воздуха микробных клеток (спор, фрагментов мицелия) на поверхность плотной питательной среды сусло-агар и подсчета выросших колоний по культурально-морфологическим признакам на день развития.

Косвенный метод измерения концентрации штамма-продуцента основан на аспирации из воздуха микробных клеток на поверхность плотной питательной селективной среды и подсчета выросших колоний по зонам просветления, образующихся вокруг каждой колонии штамма как результат продукции целлюлазы на среде с окрашенной целлюлозой.

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

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	
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 100 мм	
Пробирки биологические, вместимостью 20 и 35 мл	ГОСТ 10515—75
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

Агаризованное пивное сусло 5—6 °Б для штамма-продуцента (агар – 1,8 %, pH 5,0—6,0, режим стерилизации 1,1—1,2 ати в течение 30 мин)	
Молочная кислота, синоним-альфа-оксипролиновая кислота (из расчета 0,4 мл на 100 мл среды сусло-агар для подавления посторонней бактериальной микрофлоры)	ГОСТ 490—79
Бенгальский розовый	
Диметилсульфоксид	
Спирт этиловый ректификат	ГОСТ 5962—67
Селективная среда для штамма-продуцента. Состав среды: KH_2PO_4 – 1 г; $MgSO_4\ 7H_2O$ – 0,5 г; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,7 г; целлюлоза порошковая *в пересчете на сухое вещество* – 0,9 г; *лактоза* – 0,3 г; дрожжевой экстракт – 0,5 г; агар – 18 г; вода дистиллированная – до 1 000 мл	

6. Требования безопасности

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

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

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

6.3. 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).

6.4. 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 штамма-продуцента воздух аспирируют при помощи аппарата Кротова со скоростью 10 л/мин на поверхность плотной питательной среды. Время аспирации воздуха (1—10 мин) зависит от предполагаемой концентрации клеток продуцента (прямой метод позволяет учитывать на чашке до 200 колоний продуцента, косвенный – до 30—50 колоний на чашке).

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 подвижной 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 среду суслоагар расплавляют, остужают до 50—60 °С, добавляют молочной кислоты из расчета 0,4 мл на 100 мл среды (для подавления посторонней бактериальной микрофлоры), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

При выполнении анализа воздуха рабочей зоны косвенным методом селективную среду расплавляют, остужают до 60 °С, добавляют 50 мг/л бенгальского розового, растворенного в 1 мл диметилсульфоксида, тщательно перемешивают и разливают по 10 мл в стеклянные чашки Петри на горизонтальной поверхности. Бенгальский розовый предназначен для специфического окрашивания целлюлозы и для ограничения разрастания колоний на чашках.

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 на 42 °С (для интенсификации развития). Через 3 суток производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам и характерной пигментации среды (прямой метод) или зон просветления вокруг выросших колоний продуцента (косвенный метод) как результат продукции целлюлолитических ферментов на среде с окрашенной целлюлозой.

10. Вычисление результатов измерения

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

$$X = \frac{N \cdot 1000}{V}, \text{ кл./м}^3, \text{ где}$$

X – концентрация клеток продуцента в воздухе;

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 форме.

Протокол №
количественного микробиологического анализа штамма-продуцента *Trichoderma viride* 44-11-62/3 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.

5. Бабьева И. П., Зенова Г. М. Биология почв. М.: МГУ. 122 с.

Содержание

Предельно допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в воздухе рабочей зоны: ГН 2.1.6.1762—03 1

Метод микробиологического измерения концентрации клеток *Aspergillus awamori* ВНИИгенетика 120/177 – продуцента глюкоамилазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1776—03 9

Метод микробиологического измерения концентрации клеток *Aspergillus terreus* 44-62 – продуцента ловастатина в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1777—03 15

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* 65 – продуцента нейтральной протеиназы и амилазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1778—03 21

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* 72 – продуцента щелочной протеазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1779—03 27

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus subtilis* 103 (Ч-15) – продуцента нейтральной протеазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1780—03 33

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Bacillus licheniformis* 1001 – продуцента бацитрацина в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1781—03 40

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Candida tropicalis* Y-456 – продуцента ксилита в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1782—03 47

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Penicillium canescens* F-832 – продуцента ксиланазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1783—03 53

Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма *Trichoderma viride* 44-11-62/3 – продуцента комплекса целлюлолитических ферментов в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1784—03 60

Предельно допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в воздухе рабочей зоны

Гигиенические нормативы
ГН 2.1.6.1762—03

Методические указания
МУК 4.2.1776—4.2.1784—03

Тираж 50 экз Заказ № 2095

Отпечатано в ФГУП ЦПП

gost.e-ecolog.ru