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 *Penicillium canescens* F-832 – продуцента ксиланазы в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.2.1783—03

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *Penicillium canescens* F-832 – продуцента ксиланазы в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 100 до 3 000 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 лабораториях предприятий, организаций и учреждений, аккредитованных в установленном порядке на право проведения микробиологических исследований.

2. Характеристика штамма-продуцента ксиланазы

Микроорганизм *Penicillium canescens* F-832 является продуцентом фермента ксиланазы. Штамм растет на различных агаризованных и жидких средах. Культура образует цепочки спор, обычно прямые или слегка извилистые, с гладкой оболочкой. На твердом сусло-агаре на 3 сутки роста при температуре 30 °С образует округлые радиально-складчатые морщинистые колонии с кремовым или сероватым налетом,

диаметром 2—3 мм. На 4—5 сутки инкубации размеры колонии достигают 5—7 мм, конфигурация и складчатость колоний не изменяется, образуется воздушный мицелий со спорами бежевато-серого цвета, подошва колоний оранжево-коричневая.

Штамм устойчив практически ко всем широко известным антибиотикам.

ПДК штамма в воздухе рабочей зоны 2 000 кл/м^3, А.

3. Пределы измерений

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

4. Метод измерений

Прямой метод основан на аспирации из воздуха клеток продуцента ксиланазы на поверхность плотной питательной среды (сусло-агар) и подсчета выросших колоний по типичным морфологическим признакам.

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 ксиланазы 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

Антибиотики: группы пенициллина, тетрациклина, цефалоспорина и др. амфотерицин или нистатин	
Спирт этиловый ректификат	ГОСТ 5962—67
Среда для штамма-продуцента: агаризованное пивное сусло 5—6 °Б для штамма-продуцента (агар – 1,8 %, pH 5,9—6,1, режим стерилизации 1,1—1,2 ати в течение 30 мин)	
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 продуцента ксиланазы 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. «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, 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 продуцента ксиланазы 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.

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

Прямой метод предполагает учет количества типичных по морфологическим признакам колоний выросших на 3—5 сутки после посева воздуха и позволяет учитывать на чашке до 200 колоний продуцента.

Сусло-агар расплавляют, остужают до 60 °С, добавляют свежеприготовленный в стерильной дистиллированной воде раствор одного из антибиотиков из расчета 50 мкл на 1 мл среды (пенициллин, стрептомицин, цефалотин или другой), для подавления посторонней бактериальной микрофлоры) и нистатина или амфотерицина 15 мкг/мл для подавления грибковой флоры. Чашки с застывшей средой помещают в термостат на сутки при температуре 37 °С, после чего проросшие чашки бракуют, стерильные чашки используют для контроля воздуха.

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.

После отбора проб воздуха чашки Петри помещают в термостат на 30 °С. На 3—5 сутки производят подсчет выросших типичных колоний продуцента по культурально-морфологическим признакам или по зонам просветления вокруг колоний как результат действия ксиланазы на окрашенную целлюлозу. При необходимости культуру подвергают микроскопированию.

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).

В случае невозможности использования аппарата Кротова, рекомендуется 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, за 1 мин – 2 л воздуха. Площадь чашки Петри диаметром 100 мм равна 78,54 $см^2$.

Составляем пропорцию:

на 100 см^2 за 1 мин оседает 2 л воздуха

на 78,54 см^2 X л

$X = 1{,}57$ л/мин

Следовательно, на стеклянную чашку Петри за 1 мин оседает 1,57 л воздуха.

Надо определить количество клеток в 1 м^3 воздуха.

На 1 чашку (диаметр 100 мм) за 1 мин оседает количество микробов, содержащихся в 1,57 л воздуха, за T мин – 1,57 T л.

В этом количестве содержится N колониеобразующих единиц (микробных клеток – спор, обрывков мицелия), а в 1 м^3 воздуха содержится

$$\frac{N \cdot 1000}{1{,}57\,T} = \frac{N \cdot 636{,}9}{T}$$

Пример: за 30 мин седиментации выросло 12 колоний микроорганизма. В 1 м^3 воздуха содержится

$$\frac{12 \cdot 636{,}9}{30} = 253 \text{ клетки}$$

11. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по форме.

Протокол №

количественного микробиологического анализа штамма *Penicillium canescens* F-832 – продуцента ксиланазы 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

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