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 *Bacillus subtilis* 103 (Ч-15) – продуцента нейтральной протеазы в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.2.1780—03

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *B. subtilis* 103 – продуцента нейтральной протеазы 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 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. Биологическая характеристика B. subtilis 103 и его гигиенический норматив

Штамм-продуцент растет на жидких и агаризованных средах. Оптимальная температура роста 37 °С, оптимальная pH 6,6—7,2, культивирование 18—24 часа. Для размножения используется мясопептонная агаризованная среда (МПА) с глюкозой (1 %).

Систематическое положение микроорганизма.

Класс	*Schizomycetes*
Отряд	*Eubacteriales*
Семейство	*Bacillaceae*
Род	*Bacillus*
Вид	*subtilis*
Штамм	103 (Ч-15)

На среде МПА с глюкозой штамм образует крупные округлые колонии, максимальный диаметр которых составляет 1,2—1,3 см. Край колоний слабо волнистый, с мелкими развитыми складками в центральной верхней части. Колонии плоские, матовые, слизистые, прилипающие и тянущиеся за петлей. Не врастают в агар и легко отделяются от него. Цвет от слабо кремового до желтоватого.

Морфологически штамм представлен подвижными палочками 0,8—1,5—2,0 мкм, образующими центрально расположенные эндоспоры 0,6—0,8 мкм, располагаются поодиночке или цепочками различной длины. Палочки снабжены жгутиками, расположенными перитрихиально.

B. subtilis 103 аэроб, сапрофит, мезофил, грамположителен. Он интенсивно разлагает белковые среды благодаря действию протеолитических энзимов, при этом на желатине наблюдается разжижение, в среде лакмус-молоко -- пощелочение, пептонизация. Чувствителен к целому ряду антибиотиков, умеренно чувствителен к ампицилину.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воздухе рабочей зоны – 50 000 кл./м^3, 4 класс опасности.

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 агаризованную среду МПА с

глюкозой (1 %) и подсчета количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам.

Косвенный метод основан на аспирации из воздуха клеток микроорганизма на поверхность плотной питательной среды (молочный агар Эйкмана) и подсчета прозрачных зон, образующихся вокруг выросших колоний и четко выделяющихся на общем молочно-мутном фоне среды через 18—24 часа.

При данном методе на одной чашке Петри после забора пробы может быть учтено не более 50 колоний, т. к. большее количество колоний на чашке образуют сливающиеся зоны пептонизации молочного белка казеина под действием нейтральной протеазы.

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 1770—74
Колбы конические, вместимостью 250 и 500 мл	ГОСТ 1770—74
Секундомер	ГОСТ 9586—75
Барометр	ГОСТ 246 96—79
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556—81

5.2. Реактивы, растворы

Антибиотики: ампициллина натриевая соль, нистатин	
Спирт этиловый ректификат	ГОСТ 5962—67
Агаризованная среда МПА с глюкозой (глюкоза – 1 %, агар – 1,5—1,8%, pH 6,6—7,2, режим стерилизации 1,1—1,2 ати в течение 30 мин)	
Молочный агар Эйкмана (10 мл среды МПА и 2,5—3 мл стерильного молока – содержание жира не более 2 %, белка – 2,8 % – смешать ex tempore)	

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, 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 микроорганизма воздух аспирируют при помощи аппарата Кротова со скоростью 10 л/мин на поверхность плотной питательной агаризованной среды МПА с глюкозой или на молочный агар Эйкмана. Время аспирации воздуха (1—10 мин) зависит от предполагаемой концентрации клеток штамма-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

При выполнении анализа воздуха прямым методом агаризованную среду МПА расплавляют, остужают до 50—60 °С, добавляют свежеприготовленный в стерильной дистиллированной воде раствор антибиотика ампициллина из расчета 10—15 мкг на 1 мл среды (для подавления посторонней бактериальной микрофлоры), раствор нистатина из расчета 10 мкг на мл среды (для подавления грибковой флоры), стерильный раствор глюкозы (1 %), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

При выполнении анализа воздуха рабочей зоны косвенным методом к уже приготовленному МПА добавляют, соблюдая все правила асептики, стерильного молока из расчета 10 мл МПА и 2,5—3,0 мл молока 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 на 37 °С. Через 18—24 часов производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам (прямой метод) или прозрачных зон вокруг выросших колоний продуцента на общем молочно-

мутном фоне среды (косвенный метод) как результат ферментативного действия нейтральной протеазы на молочный белок – казеин.

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 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 аппарата Кротова, 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/мин. Количество клеток в 1 м^3 воздуха определяем по вышеприведенной формуле, где V = 1,57 л/мин × t (время аспирации, мин).

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

11. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по форме.

Протокол №
количественного микробиологического анализа штамма-продуцента *Bacillus subtilis* 103 (Ч-15) 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