Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации *Beauveria bassiana* ОРВ-43 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3530—18

Издание официальное

Москва • 2018

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации *Beauveria bassiana* ОРВ-43 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3530—18

ББК 51.21
М54

М54 **Метод** микробиологического измерения концентрации *Beauveria bassiana* ОРВ-43 в воздухе рабочей зоны: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.—10 с.

ISBN 978–5–7508–1675–0

1. Разработаны и подготовлены ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава России (Н. И. Шеина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 24 ноября 2017 г. № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 1 февраля 2018 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.21

ISBN 978–5–7508–1675–0

© Роспотребнадзор, 2018

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
1 февраля 2018 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод микробиологического измерения концентрации *Beauveria bassiana* ОРВ-43 в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.2.3530—18

1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода микробиологического количественного анализа концентрации *Beauveria bassiana* ОРВ-43 в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 до 500 000 клеток в 1 $м^3$ воздуха.

1.2. Методические указания носят рекомендательный характер.

2. Биологическая характеристика штамма *Beauveria bassiana* ОРВ-43 и его гигиенический норматив в воздухе рабочей зоны

Штамм *Beauveria bassiana* ОРВ-43 является энтомопатогенным микроорганизмом, выделенным из личинок колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*) третьего поколения и прошедшим серию длительных лабораторных пассажей с заражением различных вредителей и последующей реизоляцией. Была проведена идентификация штамма ОРВ-43 на базе ГНУ ВНИИ сельскохозяйственных микроорганизмов Россельхозакадемии с использованием метода секвенирования ITS региона. По результатам работы микроорганизм был отнесен к виду *Beauveria bassiana*.

Штамм является активным началом препарата Биослип БВ, Ж. Инсектицид «Биослип БВ, Ж» состоит из жизнеспособных бластоспор, конидий, остатков мицелия штамма *Beauveria bassiana* ОРВ-43 и культуральной жидкости, представляющей собой водный раствор остатков

питательной среды и продуктов жизнедеятельности культуры штамма. Содержание жизнеспособных конидий *Beauveria bassiana* ОРВ-43 в биологическом инсектициде составляет не менее 1×10^8 КОЕ/мл

Штамм *Beauveria bassiana* ОРВ-43 является патогеном для широкого спектра насекомых-вредителей, механизм действия которого характеризуется попаданием жизнеспособных конидий и/или бластоспор штамма на поверхность тела насекомого с последующим прорастанием мицелия во внутренние ткани насекомого, сопровождаемым гибелью последнего.

При попадании на покровы насекомых конидии и бластоспоры прорастают сквозь них, образуя мицелий, и постепенно проникают в гемолимфу, где гриб начинает активно размножаться, распространяясь по всему телу насекомого. При этом гриб потребляет растворенные в гемолимфе питательные вещества и продуцирует токсины, в частности, боверин. В результате насекомое гибнет от истощения и интоксикации. Развивающийся мицелий выходит через покровы насекомого на поверхность, на нем образуются споры, которые при попадании на поверхность следующей генерации насекомых заражают их, и цикл повторяется. Штамм не обладает патогенностью в отношении полезных и нейтральных для человека членистоногих в агроценозах.

Систематическое положение штамма

Царство	*Fungi*
Отдел	*Coelomycetes* (митоспоровые грибы)
Класс	*Hyphomycetes*
Род	*Beauveria*
Вид	*bassiana*
Штамм	ОРВ-43

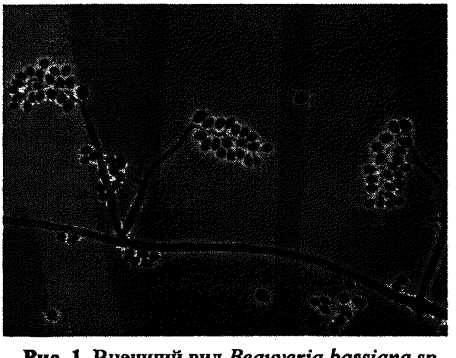

Рис. 1. Внешний вид *Beauveria bassiana sp.*

Мицелиальный гриб образует практически одинаковые колонии на среде Сабуро и картофельно-декстрозном агаре, достигающие 25—30 мм в диаметре на 10 сутки роста при 23 °С. Колонии войлочные, плотно прилегающие к поверхности среды, белого цвета, обладают слабым невнятным запахом. С возрастом поверхность колоний становится мучнистой. Обратная сторона колонии имеет желтоватую окраску, растворимый пигмент отсутствует.

При микроскопировании обнаруживаются септированные, разветвленные, бесцветные вегетативные гифы с гладкими стенками, 1—2 мкм шириной. Конидиеносцы образуются латерально на воздушных гифах.

Конидиогенные клетки расположены одиночно, парами или пучками, с расширенным основанием и тонкой вытянутой вершиной с зигзагообразным недетерминированным рахисом (окончанием), несущим одиночные шаровидные гладкие конидии шириной 2—3 мкм.

Конидии бесцветные, несептированные, с тонкими гладкими стенками, имеют размер 2—3 мкм, форму, близкую к сферической, иногда со слабозаметной выемкой у основания. В массе конидии белого цвета, агрегированы в сферические кластеры среди воздушного мицелия.

Штамм *Beauveria bassiana* ОРВ-43 по критериям вирулентности, токсичности, токсигенности и диссеминации относится к непатогенным микроорганизмам для теплокровных животных. Он не является фитопатогенном, а также не входит в состав 4 групп патогенности в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами» в редакции Дополнений и изменений № 2, утвержденных Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.06.2011 № 86.

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

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнения измерений количества клеток в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 до 500 000 клеток в 1 м^3 воздуха при доверительной вероятности 0,95.

4. Методы измерений

Метод основан на аспирации из воздуха производственных помещений конидий и/или бластоспор гриба на среду Сабуро и подсчета количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам.

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

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

5.1. Средства измерений

Барометр-анероид с диапазоном измерения атмосферного давления 5—790 мм рт. ст. и пределом допустимой погрешности ± 2,5 мм рт. ст.	ТУ 2504-1799—75
Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности ± 0,2 мг	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные 2-100-2, 2-250-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770—74
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25 и 50 $см^3$	ГОСТ 1770
Термометр лабораторный шкальный, пределы измерения 0—55 °С	ТУ 25-2021.003—88
Аспирационный аппарат и устройство для отбора проб воздуха	

Примечание. Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

5.2. Вспомогательные устройства и материалы

Шкаф сушильный стерилизационный, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 9452-010-00141798—02
Термостаты, позволяющие поддерживать рабочую температуру (27 ± 2) °С и (37 ± 2) °С	ТУ 9452-002-00141798—97
Автоклав электрический	ГОСТ 9586—75
Стерилизаторы паровые медицинские	ГОСТ Р ЕН 13060—11; ГОСТ Р 51935—02
Дистиллятор	ТУ 4952-007-33142130—2000
Облучатель бактерицидный настенный	ТУ 9444-015-03965956—08
Холодильник бытовой	ГОСТ 26678—85

Микроскоп биологический с иммерсионной системой	
Лупа с увеличением ×10	ГОСТ 25706—83
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932—90
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932—90
Воронки конусные диаметром 40—45 мм	ГОСТ 25336—82
Груша резиновая	ТУ 9398-005-0576-908
Петля бактериологическая	
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556—81
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76

Примечание. Допускается применение оборудования и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

5.3. Реактивы и питательные среды

Среда Сабуро	ГОСТ 10444.12—18
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—90
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ Р 51652—2000 или ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый технический	ГОСТ 17299—78
Канамицина сульфат	

Примечание. Допускается использование других питательных сред и диагностических препаратов с аналогичными характеристиками.

6. Требования безопасности

При выполнении измерений концентрации клеток в воздухе рабочей зоны соблюдают следующие требования.

6.1. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

6.2. СП 1.3.2518—09 Дополнения и изменения № 1 к СП 1.3.2322—08.

6.3. Правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007—76.

6.4. Требования по электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019—09 и инструкции по эксплуатации прибора.

6.5. 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 допускаются лица с высшим или средним специальным образованием, прошедшие соответствующую подготовку и имеющие навыки работы в области микробиологических исследований.

8. Условия измерений

Приготовление сред, подготовку к анализу проводят в следующих условиях:

– температура воздуха (20 ± 5) °С;
– атмосферное давление 760 ± 20 мм рт. ст.;
– влажность воздуха не более 80 %.

9. Приготовление питательных сред

Для приготовления агаризованной среды Сабуро 62 г препарата размешивают в 1 дм^3 воды, кипятят до полного растворения препарата и фильтруют через ватно-марлевый тампон. Стерилизуют среду в течение 15 мин при температуре (121 ± 1) °С. Для подавления роста посторонней микрофлоры ex tempore в готовую и охлажденную до температуры (48 ± 2) °С среду добавляют канамицин из расчета 50 мкг/мл среды, после чего разливают в чашки Петри.

Среду хранят в герметично закрытой упаковке в помещении с относительной влажностью не более 60 % и температурой от 5 до 25 °С.

10. Проведение измерения

10.1. Отбор проб воздуха

Отбор проб воздуха проводят с учетом требований ГОСТ 12.1.005—88 с изменением № 1 «ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны» и ГОСТ 8.563—96. «ГСИ. Методики выполнения измерений».

Для этого воздух аспирируют при помощи пробоотборника на поверхность плотной питательной среды в соответствии с технической документацией (инструкцией) на прибор. Время аспирации и объем отбираемого воздуха зависит от предполагаемой концентрации микроорганизма.

Аппарат перед каждым отбором пробы воздуха тщательно протирают 96° этиловым спиртом. Особенно тщательно обрабатывают поверхность подвижного диска и внутреннюю стенку прибора; наружную и внутреннюю стенку крышки. На подвижной диск устанавливают под-

готовленную чашку Петри со средой, одновременно снимая с нее крышку. Прибор закрывают. Соприкосновение крышки прибора со средой недопустимо (количество питательной среды в чашки вносят в соответствии с инструкцией к прибору). 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.

10.2. Выполнение анализа

При выполнении анализа воздуха стерильную среду Сабуро расплавляют, остужают до температуры (48 ± 2) °С, добавляют канамицин из расчета 50 мкг/мл среды и разливают в чашки Петри.

Контроль чистоты розлива проводят в соответствии с п. 7.1.1 МУК 4.2.2316—08. Для этого чашки с застывшей средой помещают в термостат при температуре 37 °С не менее чем на 18 часов. Проросшие чашки бракуют, стерильные чашки используют для контроля воздуха. Разлитую в чашки питательную среду хранят при температуре (2—8) °С не более 10 дней.

После отбора проб воздуха чашки Петри помещают в термостат с температурой (27 ± 2) °С. Через 5—7 суток производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам.

Ростовые свойства используемой питательной среды должны быть проверены до проведения анализа воздуха в соответствии с требованиями к ростовым свойствам питательных сред, руководствуясь МУК 4.2.2316—08. Для этого эталонный музейный штамм *Beauveria bassiana* ОРВ-43 высевается на 2—3 чашки используемой среды.

Лиофилизованную культуру музейного штамма необходимо использовать 2—3 пассажа во избежание потери им заданных ростовых свойств.

11. Вычисление результатов измерения

Расчет концентрации клеток производят по формуле:

$$K = (П \times 1\,000) / C \times T \quad \text{кл./м}^3\text{, где}$$

K – концентрация *Beauveria bassiana* ОРВ-43 в воздухе, кл./м^3;

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

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

C – скорость аспирации воздуха, л/мин;

T – время аспирации, мин.

12. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по ниже приведенной форме.

Протокол №
количественного микробиологического анализа *Beauveria bassiana* ОРВ-43
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) _____
3. Вид пробоотборника _____
4. Дата последней метрологической поверки оборудования для отбора проб __
5. Питательная среда, время инкубации _____
6. Результаты испытания ростовых свойств питательной среды _____
7. Количественная и качественная характеристика выросших колоний (количество типичных колоний) _____
8. Результаты идентификации микроорганизмов *Beauveria bassiana* ОРВ-43 (морфологические признаки) _____
9. Результаты расчета концентрации штамма _____
10. Соотношение полученных результатов с уровнем ПДКр.з. _____
11. Отбор пробы проведен (Ф.И.О., должность, дата, подпись) _____
12. Идентификация штамма и расчет концентрации проведены (Ф.И.О., должность, дата, подпись) _____

Метод микробиологического измерения концентрации *Beauveria bassiana* ОРВ-43 в воздухе рабочей зоны

Методические указания
МУК 4.2.3530—18

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 27.12.18

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75

Тираж 100 экз. Заказ 87

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
Федеральным центром гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел.: 8 (495) 633-86-59