

**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**

4.2. МЕТОДЫ КОНГРОЛЯ. 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 licheniformis* 1001 – продуцента бациллина в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.2.1781—03

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *B. licheniformis* 1001 – продуцента бациллина в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 до 500 000 клеток в 1 м³ 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. licheniformis* 1001 и его гигиенический норматив

Систематическое положение микроорганизма

Класс	<i>Schizomycetes</i>
Отряд	<i>Eubacteriales</i>
Семейство	<i>Bacillaceae</i>
Род	<i>Bacillus</i>
Вид	<i>licheniformis</i>
Штамм	1001

На МПА штамм образует большие округлые колонии, максимальный диаметр которых составляет 0,8—1,1 см. В центре колонии наблюдается плотное матовое желтоватого цвета уплотнение, максимальный диаметр которого может составлять 0,3—0,5 см. Вокруг него располагается прозрачная складчатая кайма, края которой сильно изрезаны. Колонии гладкие, плоские, матовые. Не врастает в агар и легко отделяются от него. Цвет белесый с желтоватым оттенком.

Морфологически штамм представлен подвижными мелкими толстыми короткими палочками, образующими центрально расположенные эндоспоры, располагаются поодиночке или небольшими конгломератами, редко образуют цепочки. Палочки снабжены жгутиками, расположенными перитрихиально.

B. licheniformis аэроб, сапрофит, мезофил, грамположителен. Чувствителен к целому ряду антибиотиков, умеренно чувствителен к бензилпенициллину.

Штамм-продуцент растет на жидких и агаризованных средах. Оптимальная температура роста 36—38 °С, оптимальная pH 7,0—8,0, культивирование 7 суток. Для размножения используется мясопептонная агаризованная среда (МПА).

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воздухе рабочей зоны — 50 000 кл./м³, пометка А, 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 м³ воздуха при доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Прямой метод основан на аспирации из воздуха производственных помещений клеток микроорганизма на агаризованную среду МПА и

МУК 4.2.1781—03

подсчета количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам.

Косвенный метод основан на аспирации из воздуха клеток микробиогенеза на поверхность плотной питательной среды (МПА) и подсчета зон задержки роста тест-культуры *Micrococcus luteus* ATCC 10240 через 24—48 часов. При данном методе на одной чашке Петри после забора пробы может быть учтено не более 50 колоний на чашке, т. к. большое количество колоний на чашке образуют сливающиеся зоны задержки роста тест-культуры под действием антибиотика бациллина.

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 реагент

Агаризованная среда МПА (агар – 1,5—1,8 %,
рН 7,0—8,0, режим стерилизации 1,1—1,2 ати
в течение 30 мин)

Тест-культура *Micrococcus flavus* ATCC 10240
(Гос. научно-контрольный институт
ветеринарных препаратов)

ГОСТ 5962—67

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 ($20 \pm 5^{\circ}\text{C}$), 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. 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 чаши. 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 иштагина из расчета 10 мкг на 1 мл среды (для подавления грибковой флоуры), тщательно перемешивают и разливают в чаши Петри.

Чаши с застывшей средой помещают в термостат на сутки при температуре 37 °С, после чего проросшие чаши бракуют, стерильные чаши используют для конгроля воздуха.

После отбора проб воздуха чаши Петри помещают в термостат с температурой 40 °С (для интенсификации развития бактерии). Через 48—72 часа производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам (прямой метод).

При выполнении анализа воздуха производственных помещений косвенным методом чаши Петри с пробами вынимают из термостата через 24 часа, инкубируют в парах хлороформа не менее 20—30 мин в вытяжном шкафу. Затем чаши оставляют на 2 ч при комнатной температуре для преддиффузии и наслаживают верхний слой среды МПА, в которую предварительно вносят взвесь 18—20 часовой тест-культуры

Micrococcus flavis из расчета 2 мл 1-миллиардной взвеси на 100 мл среды. Затем чашки инкубируют в термостате при 28—32 °C в течение 16—18 часов и подсчитывают количество зон задержки роста тест культуры под действием бациллазина.

10. Вычисление результатов измерения

Расчет концентрации клеток продуцента в пересчете на 1 м³ 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 м³ 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 см² 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 см². Составляя пропорцию, определяем, что за 1 мин на стеклянную чашку Петри оседают клетки из 1,57 л/мин. Количество клеток в 1 м³ воздуха определяем по вышеприведенной формуле, где $V = 1,57 \text{ л/мин} \times t$ (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 licheniformis* 1001 в воздухе рабочей зоны

1. Дата проведения анализа _____
2. Место отбора пробы _____
3. Название лаборатории _____
4. Юридический адрес организации _____

МУК 4.2.1781—03

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. Ахматова Э. А. Санитарно-микробиологическая характеристика воздуха рабочих помещений Фрунзенского завода кормовых антибиотиков //Здравоохранение Киргизии, 1983. № 4. С. 12—15.
6. Даниелова Л. Т., Амбарцумян Л. А. К методике определения остаточных количеств бациллера в пищевых продуктах животноводства //Антибиотики, 1980. Т. 25. № 1. С. 41—44.

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 <i>Aspergillus awamori</i> ВНИИгенетика 120/177 – продуцента глюкоамилазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1776—03.....	9
Метод микробиологического измерения концентрации клеток <i>Aspergillus terreus</i> 44-62 – продуцента ловарастатина в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1777—03.....	15
Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма <i>Bacillus subtilis</i> 65 – продуцента нейтральной протеиназы и амилазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1778—03	21
Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма <i>Bacillus subtilis</i> 72 – продуцента щелочной протеазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1779—03	27
Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма <i>Bacillus subtilis</i> 103 (Ч-15) – продуцента нейтральной протеазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1780—03	33
Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма <i>Bacillus licheniformis</i> 1001 – продуцента бацитранина в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1781—03.....	40
Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма <i>Candida tropicalis</i> Y-456 – продуцента ксилита в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1782—03	47
Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма <i>Penicillium canescens</i> F-832 – продуцента ксиланазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.1783—03	53
Метод микробиологического измерения концентрации клеток микроорганизма <i>Trichoderma viride</i> 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