

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Методы микробиологического измерения
концентрации клеток мицелиального
гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420
ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз,
 β -глюканыазы и ксиланазы
в атмосферном воздухе населенных мест
и воздухе рабочей зоны**

Сборник методических указаний
по методам контроля
МУК 4.2.3034—12; 4.2.3035—12

Издание официальное

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

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Методы микробиологического измерения
концентрации клеток мицелиального гриба
Trichoderma longibrachiatum TW-420 ВКМ
F-3880D – продуцента целлюлаз, β -глюканазы и
ксиланазы в атмосферном воздухе населенных
мест и воздухе рабочей зоны**

**Сборник методических указаний
по методам контроля
МУК 4.2.3034—12; 4.2.3035—12**

ББК 51.21
М54

М54 Методы микробиологического измерения концентрации клеток мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз, β -глюканызы и ксиланызы в атмосферном воздухе населенных мест и воздухе рабочей зоны: Сборник методических указаний по методам контроля.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—16 с.

ISBN 978—5—7508—1127—4

1. Разработаны ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им Н. И. Пирогова» Минздрава России (д.б.н. Н. И. Шеина).

2. Методические указания одобрены и рекомендованы секцией «Гигиенические аспекты биотехнологии и микробного загрязнения окружающей среды» Проблемной комиссии «Научные основы гигиены окружающей среды».

3. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 20 июля 2012 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.21

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 9.11.12

Формат 60x88/16

Тираж 200 экз.

Печ. л. 1,0
Заказ 64

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
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2012
© Федеральный центр гигиены и
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012

Содержание

| | |
|--|----|
| Метод микробиологического измерения концентрации клеток мицелиального гриба <i>Trichoderma longibrachiatum</i> TW-420 ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз, β -глюканазы и ксиланазы в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.3034—12 | 4 |
| Метод микробиологического измерения концентрации клеток мицелиального гриба <i>Trichoderma longibrachiatum</i> TW-420 ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз, β -глюканазы и ксиланазы в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.3035—12 | 11 |

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко

20 июля 2012 г.

Дата введения: с момента утверждения

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Метод микробиологического измерения концентрации
клеток мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum*
TW-420 ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз,
 β -глюканазы и ксиланазы в атмосферном воздухе
населенных мест**

**Методические указания
МУК 4.2.3034—12**

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D – продуцента целлюлаз, β -глюканазы и ксиланазы в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 50 до 5 000 клеток в 1 м³ воздуха.

Методические указания разработаны с целью обеспечения микробиологического контроля штамма *Tr. longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D в атмосферном воздухе и оценки соответствия уровня его содержания гигиеническим нормативам на основе учета требований ГОСТ 17.2.4.02—81 «Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ» и ГОСТ 8.563—96 «ГСИ. Методики выполнения измерений».

Методические указания предназначены для применения в организациях Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также в санитарных лабораториях биотехнологических предприятий, микробиологических лабораториях

научно-исследовательских институтов, работающих в области гигиены окружающей среды и аккредитованных в установленном порядке на право проведения микробиологических исследований.

2. Биологическая характеристика плесневого гриба *Tr. longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D и его гигиенический норматив

Штамм мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D является продуцентом комплекса целлюлаз, β-глюканызы и ксиланазы. Получен с помощью методов многоступенчатого мутагенеза и селекции из исходной культуры *Tr. longibrachiatum* TW-307 ВКМ F-3865D. Депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН под номером ВКМ F-3880D.

Растет на агаризованных средах (Мальц-агар, глюкозо-картофельный агар, среда Чапека с дрожжевым автолизатом, сусло-агар) при t 29—34 °С в течение 7 суток, pH 3,5—5,0.

При росте на Мальц-агаре диаметр колоний достигает 80—90 мм на 7-е сутки при росте при t 25 °С. Мицелий развит преимущественно субстратный, воздушный мицелий — скудный, белого цвета. Цвет колонии первоначально белый, затем при формировании спор — зеленый. Обратная сторона колоний имеет светло-зеленовато-желтоватую окраску.

При микроскопировании штамм имеет конидии, которые формируются в многочисленных компактных подушечках диаметром до 2 мм. Конидиеносцы бесцветные, гладкостенные формируются на субстратном мицелии, главные ветви которого длинные и прямые, иногда извитые. Боковые ветви короткие, формируются через неравные интервалы под углом к главным ветвям. Фиалиды одиночные, булавовидные или бутыльковидные, размер 5—10 × 2—3 мкм. Конидии одноклеточные, зеленоватые, гладкостенные, эллипсоидные размером 4—7 × 2—4 мкм собраны в мелкие головки на вершинах фиалид.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений количества клеток плесневого гриба в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 50 до 5 000 клеток в 1 м³ воздуха при доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Метод основан на аспирации из воздуха клеток плесневого гриба на поверхность плотной питательной среды и подсчета выросших коло-

ний по типичным культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам.

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

| | |
|---|-------------------------|
| Импактор микробиологический «Флора – 100» | ТУ 9443-001-05031637—02 |
| Прибор для бактериологического анализа воздуха, модель 818 (щелевой прибор Кротова) | ТУ 64-12791—77 |
| Прибор MAS – 100 ECO фирмы Merk (Германия) для отбора проб воздуха | |
| 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 |
| Чашка Петри бактериологические плоскодонные, стеклянные, диаметром 90 мм | ГОСТ 23932—90 |
| Пробирки бактериологические П1 и П2 вместимостью 15 и 20 мл | ГОСТ 25336—82 |
| 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

| | |
|--|---------------|
| Агар микробиологический | ГОСТ 17206—84 |
| D-Глюкоза | ГОСТ 6038—79 |
| (возможно заменить раствором глюкозы для инъекций) | |

| | |
|---|--------------|
| Вода дистиллированная | ГОСТ 6709—72 |
| Спирт этиловый ректификат | ГОСТ 5962—67 |
| Кислота молочная пищевая | ГОСТ 490—79 |
| (для подкисления среды и подавления посторонней бактериальной флоры) | |
| Глюкозо-картофельный агар, г/л (очищенный картофель — 200, агар — 18—20, pH 4,5—5,0, режим стерилизации 1,1—1,2 ати в течение 30 мин, глюкоза — 15—20 перед использованием) | |
| Среда Гетчинсона, г/л (KH_2PO_4 — 0,1; NaCl — 0,1; CaCl_2 — 0,1; FeCl_3 — 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3; NaNO_3 — 2,5; агар — 2,0; дистиллированная вода) | |
| 0,5 %-й водный раствор карбоксиметилцеллюло- зы (КМЦ), вязкость μ 10 мПас, t 25 °С, вискози- метр Брукфильда LVF | |
| 0,1 %-й раствор Конго Красного (congo rot) | |

6. Требования безопасности

При выполнении измерений концентрации клеток штамма-продуцента в атмосферном воздухе соблюдают следующие требования.

6.1. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

6.2. ГОСТ 12.1.005—88 «Правила техники безопасности при работе с химическими реактивами».

6.3. ГОСТ 12.1.019—79 «Электробезопасность при работе с электроустановками» и инструкции по эксплуатации прибора.

6.4. 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).

6.5. 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 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 (760 ± 20) мм рт. ст. и влажности воздуха не более 80 %.

9. Проведение измерения

9.1. Условия отбора проб воздуха

Для определения концентрации клеток мицелиального гриба воздух аспирируют при помощи одного из пробоотборников со скоростью 10—100 л/мин на поверхность плотной питательной среды. Время аспирации воздуха (5—20 мин) зависит от предполагаемой концентрации клеток штамма-продуцента и вида пробоотборника.

Аппарат 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 глюкозо-картофельный агар расплавляют, остужают до 50—60 °С, добавляют глюкозу из расчета 15—20 г/л и молочную кислоту из расчета 2,0 мл на 500 мл среды (для подкисления среды и подавления посторонней бактериальной микрофлоры), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

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 29 °С. Через 4—7 суток производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам и характерной окраске колоний микромицета с обратной стороны чашки.

При выполнении анализа атмосферного воздуха дополнительным методом пробы воздуха отбирают на среду Гетчинсона с добавлением 0,5 %-й карбоксиметилцеллюлозы. Культивируют в термостате при t 28 °С в течение двух суток и проводят окрашивание 0,1 %-м раствором Конго красным. Учет колоний штамма производится по зонам просветления, образующимся в результате ферментации целлюлозы под действием комплекса целлюлаз.

Ростовые свойства всех используемых питательных сред должны быть проверены в соответствии с «Требованиями к ростовым свойствам питательных сред» (Государственная Фармакопея СССР, изд. XI, вып. 2, с. 208), что позволит более полно оценить пределы ошибки метода. Для этого эталонный музейный штамм-продуцент высевается на 2—3 чашки каждой используемой среды.

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, рекомендуем применять метод седиментации клеток продуцента из воздуха непосредственно на чашки Петри с плотной питательной средой. Время отбора проб воздуха может составлять до 60 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 $78,54 \text{ см}^2$. Составляя пропорцию определяем, что за 1 мин на стеклянную чашку Петри оседают клетки из $1,57 \text{ л/мин}$. Количество клеток в 1 м^3 воздуха определяем по вышеприведенной формуле, где $V = 1,57 \text{ л/мин} \times t$ (время аспирации, мин).

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

11. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по форме.

Протокол №
количественного микробиологического анализа штамма
***Tr. longibrachiatum* TW-420 ВКМ F-3880D**
в атмосферном воздухе населенных мест

1. Дата проведения анализа _____
2. Рабочее место (профессия работающего) _____
3. Место отбора пробы (название и адрес организации, производство, технологическая стадия, точка отбора пробы) _____
4. Вид пробоотборника _____
5. Дата последней метрологической поверки оборудования для отбора проб _____
6. Питательная среда, время инкубации _____
7. Количественная и качественная характеристика выросших колоний (количество типичных колоний, морфологические признаки, окраска по Грамму и др.) _____
8. Результаты идентификации микроорганизмов с указанием метода _____
9. Результаты расчёта концентрации штамма _____
10. Соотношение полученных результатов с уровнем ПДК_{р.з.} _____
11. Отбор пробы произведён (Ф. И. О., должность, дата, подпись) _____
12. Идентификация штамма и расчёт концентрации произведены (Ф. И. О., должность, дата, подпись) _____

Список литературы

1. РД 52.04.186—96 «Руководство по контролю загрязнения атмосферы».
2. ГОСТ 8.563—96 «ГСИ. Методики выполнения измерений».
3. ГОСТ 17.2.4.02—81 «Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ».