

**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 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 *Trichoderma viride* 44-11-62/3 –
продуцента комплекса целлюлолитических ферментов
в воздухе рабочей зоны**

**Методические указания
МУК 4.2.1784—03**

1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма – *Trichoderma viride* 44-11-62/3 продуцента комплекса целлюлолитических ферментов (целлюлаза, ксиланаза) в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 100 до 5 000 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. Характеристика штамма-продуцента *Trichoderma viride* 44-11-62/3

На агаризованной среде сусло-агар (содержание солодового сусла 5—6° по Баллингу) на 5 день развития микроорганизм образует характерные колонии до 5—5,5 см в диаметре с гладкой подошвой, слегка приподнятые над поверхностью среды, не врастающие в агар, с волнистым краем, пушистым воздушным мицелием, который покрыт спорами лимонно-желтого цвета. На 3 день развития в среду выделяется ярко-желтый пигмент лимонного оттенка. Гифы мицелия бесцветные, септированные, многократно ветвистые.

Систематическое положение микроорганизма.

Класс	<i>Fungi imperfecti</i>
Порядок	<i>Hyphomycetales</i>
Род	<i>Trichoderma</i>
Вид	<i>viride</i>
Штамм	44-11-62/3

Штамм *Trichoderma viride* 44-11-62/3 получен во ВНИИбиотехнология в лаборатории Биосинтеза ферментов методом индуцированной селекции с применением этиленimina и нитрозометилмочевины из исходной культуры *Trichoderma viride* 44 – продуцента целлюлазы и депонирован в ЦМПМ ВНИИгенетика.

Штамм-продуцент синтезирует высокоактивный комплекс целлюлолитических ферментов для производства ферментного препарата целловиридин ГЗх. Максимальная активность целлюлазы составляет 35 ед./мл, ксиланазы – 42 ед./мл.

Штамм-продуцент растет на жидких и агаризованных средах. Культивирование гриба происходит 5 суток при температуре 36—38 °С, затем 5 суток при комнатной температуре. Для размножения и хранения используется сусло-агар 5—6 °Б. рН среды – 5,0—6,0.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воздухе рабочей зоны – 2 000 кл./м³, А.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений количества клеток штамма-продуцента в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 100 до 5 000 клеток в 1 м³ воздуха при доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Прямой метод измерения концентрации штамма-продуцента основан на аспирации из воздуха микробных клеток (спор, фрагментов мицелия) на поверхность плотной питательной среды сусло-агар и подсчета выросших колоний по культурально-морфологическим признакам на день развития.

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 целлюлазы 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

Агаризованное пивное сусло 5—6 °Б для штамма-продуцента (агар — 1,8 %, рН 5,0—6,0, режим стерилизации 1,1—1,2 ати в течение 30 мин)

Молочная кислота, синоним-альфа-оксипропионовая кислота (из расчета 0,4 мл на 100 мл среды сусло-агар для подавления посторонней бактериальной микрофлоры)

ГОСТ 490—79

Бенгальский розовый

Диметилсульфоксид

Спирт этиловый ректификат

ГОСТ 5962—67

Селективная среда для штамма-продуцента.

Состав среды: KH_2PO_4 — 1 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 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 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 штамма-продуцента 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 (прямой метод позволяет учитывать на чашке до 200 колоний продуцента, косвенный — до 30—50 колоний на чашке).

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 среду суслотагара расплавляют, остужают до $50\text{—}60^\circ\text{C}$, добавляют молочной кислоты из расчета 0,4 мл на 100 мл среды (для подавления посторонней бактериальной микрофлоры), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

При выполнении анализа воздуха рабочей зоны косвенным методом селективную среду расплавляют, остужают до 60°C , 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.

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 42 °С (для интенсификации развития). Через 3 суток производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам и характерной пигментации среды (прямой метод) или зон просветления вокруг выросших колоний продуцента (косвенный метод) как результат продукции целлюлолитических ферментов на среде с окрашенной целлюлозой.

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 колоний продуцента, выросших на чашке;

1 000 – коэффициент пересчета на 1 м³ воздуха;

V – объем воздуха, л (произведение скорости на время аспирации).

11. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по форме.

Протокол №

количественного микробиологического анализа штамма-продуцента *Trichoderma viride* 44-11-62/3 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.
5. Бабьева И. П., Зенова Г. М. Биология почв. М.: МГУ. 122 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 <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 ловастагина 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 бацитрацина 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