

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Микробиологическое измерение  
концентрации *Trichoderma asperellum*  
OPF-19 в воздухе рабочей зоны**

Методические указания  
МУК 4.2.3437—17

Издание официальное

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

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

**Микробиологическое измерение  
концентрации *Trichoderma asperellum*  
OPF-19 в воздухе рабочей зоны**

**Методические указания  
МУК 4.2.3437—17**

ББК 51.21  
М59

**М59** **Микробиологическое** измерение концентрации *Trichoderma asperellum* OPF-19 в воздухе рабочей зоны: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017.—8 с.

1. Разработаны и подготовлены ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени 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 22 декабря 2016 г. № 2).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 22 февраля 2017 г.

4. Введены впервые.

**ББК 51.21**

Ответственный за выпуск Н. В. Карташева

Редактор Л. С. Кучурова  
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 09.10.17

Формат 60x84/16

Тираж 125 экз.

Печ. л. 0,5  
Заказ

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  
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения  
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора  
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2017

## УТВЕРЖДАЮ

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

А. Ю. Попова

22 февраля 2017 г.

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

### Микробиологическое измерение концентрации *Trichoderma asperellum* OPF-19 в воздухе рабочей зоны

#### Методические указания МУК 4.2.3437—17

#### 1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода микробиологического количественного анализа концентрации *Trichoderma asperellum* OPF-19 в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 до 500 000 клеток в 1 м<sup>3</sup> воздуха.

1.2. Методические указания носят рекомендательный характер.

#### 2. Биологическая характеристика штамма *Trichoderma asperellum* OPF-19 и его гигиенический норматив в воздухе рабочей зоны

Мицелиальный гриб *Trichoderma asperellum* OPF-19 является действующей субстанцией фунгицида «Оргамика Ф, Ж» (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл).

Источником выделения штамма является поверхность корней томатов, выращенных в условиях открытого грунта в Высокогорском районе Республики Татарстан.

Штамм отличается наличием широкого спектра антагонистической активности по отношению к фитопатогенным грибам, является быстрорастущим как в условиях *in vitro*, так и в естественной среде. Штамм проявляет способность эффективно колонизировать поверхность корней растений.

#### Систематическое положение микроорганизма

Класс	<i>Fungi imperfecti</i>
Порядок	<i>Hyphomycetales</i>
Род	<i>Trichoderma</i>
Вид	<i>asperellum</i>
Штамм	OPF-19

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

После 72 часов роста на глюкозо-картофельном агаре при температуре 30 °С колония штамма *T. asperellum* OPF-19 имеет максимальный диаметр 55—65 мм. Колонии образуют несколько концентрических колец, на поверхности которых заметно интенсивное спороношение.

В центральной части колония более темная, она раньше, чем периферия приобретает зеленую окраску. По мере удаления от центра формируется воздушный мицелий. При культивировании при температуре 25 °С в отсутствии света, конидии формируются через 35—45 часов. Диффузии пигмента в агар не происходит, у старых колоний присутствует слабый специфический запах.

При росте на агаризованной среде Сабуро в течение 5 суток при температуре 25 °С конидиальная зона сформирована конидиеносцами, сгруппированными в коремии и спородохии, имеющими вид многочисленных компактных подушечек диаметром до 2 мм, изначально белого цвета, с возрастом — зеленого. Подушечки образуются по всей поверхности колонии, обильно.

Конидиеносцы чаще формируются в подушечках и редко на воздушном мицелии, конидиеносцы симметричные, завершаются четырьмя фиалидами. Парные ответвления формируются ниже верхушки конидиеносца и располагаются под углом около 90° по отношению к основной оси. Первичные ветки по мере удаления от верхушки удлинняются, парные ответвления имеют одинаковую длину, на боковых ветвях первого порядка формируются неветвящиеся боковые ветви второго порядка. Ширина конидиеносца — 2,1—5,0 мкм.

Фиалиды образуются на концах ветвей первого и второго порядка, образуются скопления из 2—4 фиалид. Фиалиды прямые, колбовидные, немного расширенные в середине, длина — 5—10 мкм, ширина — 2,2—5,7 мкм. Интеркалярные фиалиды не формируются. Конидии имеют темно-зеленый цвет, форма — немного яйцевидная, часто ближе к шаровидной, диаметр — 3,5—4 мкм.

Штамм *Trichoderma asperellum* OPF-19 по критериям вирулентности, токсичности, токсигенности и диссеминации относится к непатогенным для теплокровных животных микроорганизмов.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воздухе рабочей зоны — 50 000 кл/м<sup>3</sup>.

### 3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений количества клеток в воздухе рабочей зоны в диапазоне концентраций от 50 до 500 000 клеток в 1 м<sup>3</sup> воздуха при доверительной вероятности 0,95.

#### 4. Методы измерений

Метод основан на аспирации из воздуха производственных помещений бактерий на среду Сабуро и подсчете 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 с пределом допустимой погрешности $\pm 2,5$ мм рт. ст.	ТУ 2504-1799—75
Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности $\pm 0,2$ 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 <sup>3</sup>	ГОСТ 29227—91
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25 и 50 см <sup>3</sup>	ГОСТ 1770—74
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 $(160 \pm 5)$ °С	ТУ 9452-010-00141798—02
Термостаты, позволяющие поддерживать рабочую температуру $(27 \pm 2)$ °С и $(37 \pm 2)$ °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 9398-005-0576-9082—03
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
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Спирт этиловый ректифицированный	ГОСТ Р 51652—2000 или ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый технический	ГОСТ 17299—78
Бензилпенициллина натриевая соль	
Тетрациклин	

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

**6.2.** Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Дополнения и изменения № 1 к СП 1.3.2322—08; СП 1.3.2518—09.

**6.3.** Правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.005—88.

**6.4.** Электробезопасность при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019—79 и инструкции по эксплуатации прибора.

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

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<sup>3</sup> 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 в готовую и охлажденную до температуре (48 ± 2) °С среду добавляют по 100 мг бензилпенициллина и тетрациклина, 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%-м этиловым спиртом. Особенно тщательно обрабатывают поверхность подвижного диска и внутреннюю стенки прибора, наружную и внутреннюю стенки крышки. На подвижный диск устанавливают подготовленную 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 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 термо-



стат 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 1—2 суток проводят 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 *Trichoderma asperellum* OPF-19 высевается на 2—3 чашки используемой среды.

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

### 11. Вычисление результатов измерения

Расчет концентрации клеток производят по формуле:

$$K = \frac{П \cdot 1\,000}{С \cdot T} \text{ кл./м}^3, \text{ где}$$

*K* – концентрация *Trichoderma asperellum* OPF-19 в воздухе, кл/м<sup>3</sup>;

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

1 000 – коэффициент пересчета на 1 м<sup>3</sup> воздуха;

*С* – скорость аспирации воздуха, л/мин;

*T* – время аспирации, мин.

### 12. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по нижеприведенной форме.

**Протокол № \_\_\_\_\_**  
**количественного микробиологического анализа *Trichoderma asperellum* OPF-19**  
**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) \_\_\_\_\_
4. Вид пробоотборника \_\_\_\_\_
5. Дата последней метрологической поверки оборудования для отбора проб \_\_\_\_\_
6. Питательная среда, время инкубации \_\_\_\_\_
7. Результаты испытания ростовых свойств питательной среды \_\_\_\_\_
8. Количественная и качественная характеристика выросших колоний (количество типичных колоний) \_\_\_\_\_
9. Результаты идентификации микроорганизмов *Trichoderma asperellum* OPF-19 (морфологические признаки) \_\_\_\_\_
10. Результаты расчета концентрации штамма \_\_\_\_\_
11. Соотношение полученных результатов с уровнем ПДК<sub>в.р.з.</sub> \_\_\_\_\_
12. Отбор пробы проведен (Ф. И. О., должность, дата, подпись) \_\_\_\_\_
13. Идентификация штамма и расчет концентрации проведены (Ф. И. О., должность, дата, подпись) \_\_\_\_\_