

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Методы микробиологического измерения  
концентрации клеток плесневого гриба  
*Penicillium verruculosum* PV2007 ВКМ  
F-3972D – продуцента комплекса  
карбогидраз в воздухе рабочей зоны и  
атмосферном воздухе населенных мест**

Сборник методических указаний  
по методам контроля  
МУК 4.2.3032—12; 4.2.3033—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 плесневого гриба  
*Penicillium verruculosum* PV2007 ВКМ  
F-3972D – продуцента комплекса карбогидраз  
в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе  
населенных мест**

**Сборник методических указаний  
по методам контроля  
МУК 4.2.3032—12; 4.2.3033—12**

ББК 51.21  
М54

**М54 Методы микробиологического измерения концентрации клеток плесневого гриба *Penicillium verrucosum* PV2007 ВКМ F-3972D – продуцента комплекса карбогидраз в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест: Сборник методических указаний по методам контроля.**—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—16 с.

ISBN 978—5—7508—1125—0

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 8.11.12

Формат 60x88/16

Тираж 200 экз.

Печ. л. 1,0  
Заказ 63

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 плесневого гриба <i>Penicillium verruculosum</i> PV2007 ВКМ F-3972D – продуцента комплекса карбогидраз в воздухе рабочей зоны: МУК 4.2.3032—12.....	4
Метод микробиологического измерения концентрации клеток плесневого гриба <i>Penicillium verruculosum</i> PV2007 ВКМ F-3972D – продуцента комплекса карбогидраз в атмосферном воздухе населенных мест: МУК 4.2.3033—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 плесневого гриба *Penicillium verruculosum*  
PV2007 ВКМ F-3972D – продуцента комплекса  
карбогидраз в атмосферном воздухе населенных мест****Методические указания  
МУК 4.2.3033—12****1. Общие положения и область применения**

Настоящие методические указания устанавливают методику проведения микробиологического количественного анализа концентрации клеток штамма *Penicillium verruculosum* PV2007 ВКМ F-3972D – продуцента комплекса карбогидраз в атмосферном воздухе населенных мест в диапазоне концентраций от 50 до 5 000 клеток в 1 м<sup>3</sup> воздуха.

Методические указания разработаны с целью обеспечения микробиологического контроля штамма *P. verruculosum* PV2007 ВКМ F-3972D 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 *Penicillium verruculosum* PV2007 ВКМ F-3972D и его гигиенический норматив**

Штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* PV2007 ВКМ F-3972D является продуцентом ряда карбогидраз (комплекса целлюлаз, целлобиаз и сопутствующих ферментов — ксиланазы и ксилоглюканазы). Получен с помощью методов многоступенчатого мутагенеза и селекции из исходной культуры *P. verruculosum* 27К ВКМ F-3764D. Депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН под номером ВКМ F-3972D.

Растет на азированных средах (среда Чапека с дрожжевым автолизатом, Мальц-агар, глюкозо-картофельный агар, сусло-агар) при  $t$  26—30 °С в течение 7—10 суток, pH 4,5—5,0. При  $t$  5 °С рост колоний не наблюдается.

На среде Чапека с дрожжевым автолизатом колонии достигают 23—24 мм, поверхность сильно радиально складчатая, плотная, тонкая, ростовая зона вырастает в агар, имеет ширину 1,5—2,0 мм. Мицелий светло-желтоватый, шерстистый, центр колонии выпуклый, конидиогенез слабый, серо-зеленоватого оттенка. Экссудата и растворимого пигмента нет. Обратная сторона светлая, в центре колонии — палево-оранжевая.

При микроскопировании штамм имеет конидиеносцы двухярусные, терминальные, бивертициллиатные, гладкие длиной около 150 мкм, шириной 2—3 мкм. Метулы расходящиеся размером 10—13 × 2,5—3,0 мкм, фиалиды ампуллиформные размером 7—8 × 2,8—3,0 мкм. Конидии округлые, шероховатые размером 3,0—3,5 мкм.

## **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 м<sup>3</sup> 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 колоний 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 ESO 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 $\times 10$	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 (возможно заменить раствором глюкозы для инъекций)	ГОСТ 6038—79
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Спирт этиловый ректификат	ГОСТ 5962—67
Кислота молочная пищевая (для подкисления среды и подавления посторонней бактериальной флоры)	ГОСТ 490—79
Глюкозо-картофельный агар, г/л (очищенный картофель – 200, агар – 18—20, рН 4,5—5,0, режим стерилизации 1,1—1,2 аги в течение 30 мин, глюкоза – 15—20 перед использованием)	
Среда Гетчинсона, г/л ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ – 0,1; $\text{NaCl}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2$ – 0,1; $\text{FeCl}_3$ – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; $\text{NaNO}_3$ – 2,5; агар – 2,0; дистиллированная вода)	

0,5 %-й водный раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), вязкость  $\mu$  10 мПас,  $t$  25 °С, вискозиметр 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. Санитарные правила 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».

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  $(20 \pm 5)$  °С, атмосферном давлении  $(760 \pm 20)$  мм рт. ст. и влажности воздуха не более 80 %.

## **9. Проведение измерения**

### **9.1. Условия отбора проб воздуха**

Для определения концентрации клеток плесневого 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 под-



вижного 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 стеклогграфом 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 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<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> воздуха;

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

В случае невозможности использования аппарата Кротова, рекомендуется 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<sup>2</sup> 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 см<sup>2</sup>. Составляя пропорцию определяем, что за 1 мин на стеклянную чашку Петри оседают клетки из 1,57 л/мин. Количество клеток в 1 м<sup>3</sup> 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 *P. verruculosum* PV2007 ВКМ F-3972D 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<sub>ав</sub> \_\_\_\_\_
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». М., 1991. 693 с.
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». М.: Изд-во стандартов, 1981. 3 с.