

ADAM KROGULSKI, TOMASZ PODSIADŁY

OZNACZANIE OGÓLNEJ LICZBY GRZYBÓW
W POWIETRZU ATMOSFERYCZNYM I WEWNĄTRZ POMIESZCZEŃ

TOTAL CONCENTRATION OF FUNGI IN ATMOSPHERIC AND INDOOR AIR

Zakład Higieny Komunalnej
Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: dr J. Świątczak

Polskie normy z 1989 r. dotyczące badania skażenia mikrobiologicznego powietrza atmosferycznego w dużym stopniu uległy dezaktualizacji. Polskich norm (PN) dotyczących badania zanieczyszczeń biologicznych w pomieszczeniach wewnętrznych brak. Utrudnia to lub uniemożliwia porównanie uzyskiwanych wyników między sobą i z normami zagranicznymi.

WSTĘP

W Polsce nie stosuje się ujednoliconych metod oceny mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego i powietrza pomieszczeń. W efekcie w badaniach stosuje się różne pożywki i w różny sposób osadza się mikroorganizmy na/lub w pożywce (metoda płytek lanych). W praktyce utrudnia to lub wręcz uniemożliwia porównywanie uzyskiwanych wyników.

Polskie Normy [3–6] dotyczące badania zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza atmosferycznego określają metodykę poboru próbek powietrza, skład podłoży, sposób odczytu wyników i ich interpretację z uwzględnieniem podziału na trzy klasy czystości.

Brak jest Polskiej Normy dotyczącej powietrza wewnątrz pomieszczeń. Istnieją jedynie propozycje wymagań dla wybranych pomieszczeń opracowane przez *Krzysztofika* [cyt. za 1] oraz klasy czystości mikrobiologicznej powietrza wg polskich wytycznych projektowych [7], które odnoszą się do obiektów służby zdrowia. Mimo, że są one z reguły bardziej tolerancyjne niż normy państw zachodnich i USA, większość szpitali w kraju nie ma możliwości technicznych ich dotrzymania (badania własne niepublikowane).

Wspomniane Polskie Normy, propozycje i wytyczne projektowe, pochodzą z okresu, gdy na polskim rynku nie było dostępnych aparatów zasysających powietrze (aspiratorów) i osadzających mikroorganizmy na podłożach metodą zderzeniową. Nie było również możliwości powszechnego stosowania gotowych podłoży stosowanych szeroko w krajach Europy Zachodniej i Ameryki Północnej.

W efekcie większość wyników publikowanych w ostatnich latach w Polsce trudno porównać między sobą, lub z publikacjami zagranicznymi.

Zdarza się, że zmiana metodyki pobierania próbek, lub używanych podłoży uniemożliwia porównanie wyników kolejnych ekspertyz dotyczących tego samego źródła zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza, lub potraktowanie ich jako badań wzajemnie się uzupełniających. W efekcie badania trzeba w całości wykonać od nowa.

W niniejszej pracy uznano za celowe zbadanie jak duże różnice można uzyskać, w wyniku stosowania różnych metod poboru próbek i użycia różnych podłoży.

MATERIAŁ I METODY

Podłoża:

1) *Sabouraud* dextrose agar firmy Oxoid, o pH $5,6 \pm 0,2$ bez dodatku antybiotyków – zalecane do izolacji grzybów w tym drożdży. 2) Malt extract agar firmy Oxoid o pH $5,4 \pm 0,2$ zalecane do wykrywania, izolacji i liczenia drożdży i pleśni. 3) *Schaufus – Pollinger* (krążki bibułowe z suchym podłożem „pady”) firmy *Sartorius*, zalecane dla drożdży i pleśni. Podłoże o wolniejszym w porównaniu do dwóch pierwszych powiększaniu się powierzchni rosnących kolonii.

Aparat do kontroli mikrobiologicznej powietrza Micro Bio (Air sampler MB 1 plus) firmy De Ville. Mikrobiologiczny próbnik powietrza MAS – 100 (nowa wersja 2001 r.). Oba te aparaty pracują metodą zderzeniową. MB 1 osadza materiał na płytkach typu Rodac Ø 55 mm. MAS – 100 na powszechnie używanych w mikrobiologii płytkach Ø 90 mm. Oba aparaty posiadają głowice z otworami (dyszami). Powietrze przechodzące przez jeden otwór trafia w jeden osobny punkt na pożywce. Do korekcji wyniku zanizonego w wyniku trafienia dwóch lub więcej *cfu* (jednostek tworzących kolonie) w jeden punkt wprowadza się poprawkę według wzoru *Fellera*.

Płytki z osadzonymi grzybami i ich zarodnikami umieszczano w temperaturze 25 °C (płytki z podłożami agarowymi odwrócone przykrywką do dołu). Codziennie począwszy od 48 godz. płytki przeglądano i liczono rosnące kolonie. Liczenie przerywano wówczas, gdy w kolejnym dniu nie obserwowano przyrostu liczby kolonii.

Badania porównawcze metodą zderzeniową i sedymentacyjną prowadzono w pokoju o wymiarach $3,7 \times 5,0$ i wysokości 4,1 m. Na godzinę przed rozpoczęciem pomiaru zamykano okno i drzwi (przewody wentylacji grawitacyjnej były zaklejone). W dwunastu punktach na wysokości ok. 1,3 m umieszczano obok siebie płytki z podłożami (*Sabouraud* i Malt extract agar). Jednoczesna ekspozycja wszystkich płytek trwała 30 min. Bezpośrednio po jej zakończeniu na taką samą liczbę płytek pobierano zanieczyszczenia powietrza metodą zderzeniową (na zmianę na płytkę z jednym a następnie z drugim podłożem). Objętość powietrza dobrano w taki sposób, aby liczba wyrosłych na płytkach kolonii grzybów była podobna w metodzie sedymentacyjnej i zderzeniowej. W metodzie sedymentacyjnej liczbę *cfu* (jednostek tworzących kolonie) w 1 m³ powietrza liczono korzystając z wzoru zamieszczonego w PN Z-4111/03 [5].

Oznaczana na różnych podłożach ogólna liczba grzybów może się znacznie różnić (Ryc. 1).

Dla określenia różnicy w uzyskiwanych wynikach przy użyciu różnych aspiratorów zasysano nimi równocześnie tę samą objętość powietrza na to samo podłoże. Wyniki przedstawiono w tabeli II.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki z zastosowaniem metod sedymentacyjnej i aspiracyjnej oraz podłoży *Sabouraud* i Malt extract agar przedstawiono w tabeli I.

Liczba kolonii wyrosłych na podłożu *Sabouraud* przy użyciu metody sedymentacyjnej jest prawie dwukrotnie wyższa niż na podłożu Malt extract agar. Przy użyciu metody zderzeniowej wzrost liczby kolonii wyniósł 20%. Różnica wyników uzyskanych metodą sedymentacyjną na obu używanych podłożach jest istotna statystycznie. W zamkniętym pomieszczeniu cząsteczki pyłu w tym i zarodniki grzybów oraz ich komórki opadają. Powietrze staje się coraz czystsze. Mimo to w badaniu przeprowadzonym metodą aspi-

Tabela I. Ogólna liczba grzybów. Porównanie wyników otrzymanych metodą sedymentacyjną (S) i zderzeniową (A)
Total number of fungi. Comparison of results obtained with sedimentation (S) and respiratory (A) methods

<i>Cfu/m³</i>			
Grzyby			
<i>Sabouraud</i>		Malt extract agar	
S	A	S	A
102,7	263,7	56,2	213,9

Objaśnienia: Każda wartość stanowi średnią z 12 pomiarów. Różnice między metodami są istotne statystycznie, między podłożami jedynie w metodzie sedymentacyjnej.

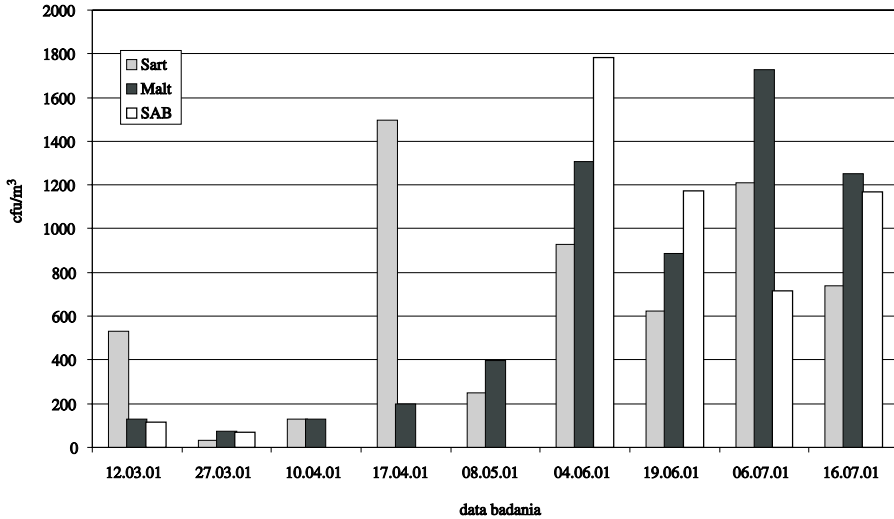
racyjną, bezpośrednio po 30 minutowym badaniu metodą sedymentacyjną liczba koloni grzybów/m³ była wielokrotnie wyższa.

W sytuacji, gdy intensywnego ruchu powietrza nie można wyeliminować (wentylacja grawitacyjna o różnym natężeniu, wentylacja mechaniczna, lub pomiary w powietrzu zewnętrznym) badania metodą sedymentacyjną będą obarczone jeszcze większym błędem. W przypadku intensywnego ruchu powietrza wyniki obarczone najmniejszym błędem można uzyskać przy użyciu aspiratora z wbudowanym miernikiem objętości rzeczywiście przepływającego przez aparat powietrza (np. MAS – 100). Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, równorzędne traktowanie danych uzyskiwanych obiema omawianymi metodami wydaje się reliktem z okresu, kiedy aspiratory były w kraju praktycznie niedostępne. W większości badań metoda sedymentacyjna musi być traktowana jako jakościowa. Pomimo, że do oznaczania ogólnej liczby grzybów stosuje się podłoża, na których rośnie wiele różnych ich gatunków nie można stworzyć podłoża na którym rosłyby wszystkie grzyby i na dodatek miałyby one podobny czas wzrostu. W efekcie stosując różne podłoża uzyskujemy różną liczbę kolonii.

Na ryc. 1 przedstawiono ogólną liczbę grzybów w powietrzu atmosferycznym oznaczoną metodą zderzeniową. W poszczególnych pomiarach pobierano tą samą objętość powietrza na różne podłoża. Przedstawione wyniki są fragmentem serii pomiarów prowadzonych przez ponad rok.

Zjawisko to nasila się w okresie od kwietnia do początku lipca (z pewnymi zmianami zależnymi od warunków meteorologicznych) kiedy obserwujemy gwałtowny wzrost liczebności grzybów i ich zarodników przy jednoczesnej bardzo wyraźnej dominacji jednej grupy taksonomicznej. Na przełomie kwietnia i maja obserwujemy często bardzo szybki wzrost dominujących w tym czasie szczepów. W efekcie często zarastają one całą powierzchnię płytki nim zauważymy wzrost innych koloni. W badaniach własnych, nie publikowanych, stwierdzano w okresie wiosennym krótkotrwałe wzrosty ogólnej liczby grzybów w powietrzu atmosferycznym do wartości przekraczających co najmniej trzykrotnie maksymalne wartości z ryc. 1. Podobne krótkotrwałe zmiany stężeń w powietrzu zarodników pojedynczych gatunków grzybów zależne od warunków meteorologicznych były wielokrotnie obserwowane [2, 7].

Porównując przedstawione w tabeli II wyniki, uzyskane przy użyciu różnych aspiratorów: MAS – 100 z płytkami o powierzchni ok. 63,5 cm² i MB 1 z płytkami o powierzchni



Ryc. 1. Ogólna liczba grzybów w powietrzu oznaczana metodą zderzeniową na trzech podłożach
Total number of fungi in the air detected with respiratory method on three media

ok. 23,4 cm² stwierdzamy, że przy zachowaniu pewnych warunków są one bardzo zbliżone. Chodzi tu przede wszystkim o utrzymanie liczby kolonii na jednej szalce w zakresie 15 – 40. Górna granica w zależności od oddziaływań między koloniami może ulegać zmianom. W okresie dominacji jednego szczepu, gdy prawie wszystkie kolonie rosną z tą samą szybkością jej wartość może być znacznie wyższa.

Oczywiście tak duża zbieżność jak w trzech pierwszych badaniach jest w dużej mierze kwestią przypadku. Jednak przy pomiarach w pomieszczeniach zamkniętych lub przy słabym wietrze w przypadku powietrza atmosferycznego wyniki nie będą się istotnie różnić. Zbyt duża liczba kolonii na płytce zawsze powoduje zaniżenie wyników. Zarówno

Tabela II. Ogólna liczba grzybów
Total number of fungi

Numer badania	Objętość (w litrach)	MAS-100 Płytki Ø 90 mm		MB 1 Płytki Ø 55 mm	
		l. koloni	cfu/m ³	l. koloni	cfu/m ³
1	200	25,7	128,3	25,7	128,6
2	500	43,0	86,0	43,0	86,0
3	100	37,5	375,0	37,9	379,0
4	50	88,5	1770,0	31,6	631,3
5	100	136,9	1369,0	59,0	590,0

Objaśnienia: Każde badanie było wykonywane w tym samym pomieszczeniu równocześnie dwoma aspiratorami (MAS – 100 i MB 1) na tym samym podłożu (Malt extract agar). Każda wartość podana w tabeli stanowi średnią z co najmniej siedmiu powtórzeń.

w wyniku antagonistycznego działania między koloniami (zanikiem części z nich nim będą widoczne) jak i przez zrastanie się koloni, lub zasłanianie wolniej rosnących. Szalki zarastają jednolitą murawą nim niektóre z gatunków utworzą widoczne makroskopowo kolonie. Potwierdzeniem zaniżania wyników w przypadku zbyt gęstego wzrostu kolonii na płytce są wyniki badań 4 i 5. Na płytkach o ok. trzykrotnie większej powierzchni wyrasta ponad dwa razy więcej kolonii. W przypadku zbyt dużej liczby kolonii na szalce należy zdawać sobie sprawę z tego, że uzyskane wyniki mogą być zaniżone. Dlatego w przypadku równoległych badań z poborem różnych objętości powietrza do ostatecznej oceny trzeba wybrać płytki z liczbą koloni nie przekraczającą 40 przy średnicy 55 mm. Zaletą aparatu MB 1 jest niższa cena i niższe koszty eksploatacji. Natomiast wadą węższy zakres objętości powietrza, z którego można pobrać materiał do badań i uzyskać wiarygodne wyniki.

WNIOSKI

1. Do badań ogólnej liczby grzybów w powietrzu należy używać metody zderzeniowej oraz równolegle dwu lub więcej podłoży powszechnie stosowanych na świecie.
2. W badaniach dotyczących jednego obiektu należy używać tych samych metod i podłoży, a najlepiej ujednolicić podstawowe wymagania dla danego typu badań.
3. Stosowanie aparatów wykorzystujących płytki o mniejszej średnicy (poniżej 90 mm) jest uzasadnione przy w badaniach rutynowych, gdy znany jest spodziewany poziom zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza.

A. Krogulski, T. Podsiadły

TOTAL CONCENTRATION OF FUNGI IN ATMOSPHERIC AND INDOOR AIR

Summary

Methods of evaluation of microbiological air pollution are not standardized in Poland. As a result of this status miscellaneous media and various methods of sedimentation of microorganisms on/or these media are applied in the studies. Additionally plates of various diameters are used. In practice it makes difficult (or even impossible) comparison of results published studies and expert's reports. To illustrate the range of the problem in the presented paper are shown results of measurements of total number of fungi performed paralelly with:

- sedimentation and respiratory methods
- plates 55 mm and 90 mm diameter
- three various media

Practical instructions concerned selection of measurements methods and interpretation of results are presented.

PIŚMIENNICTWO

1. *Charkowska A.*: Czystość powietrza w pomieszczeniach szpitalnych – wymagania i kontrola. Wyd. Instytutu Ogrzewnictwa i wentylacji PW, Warszawa 1996.
2. *Katial R., Zhang Y., Jones R., Dyer.*: Atmospheric mold spore counts in relation to meteorological parameters. *Int J. Biometeorol.* 1997. 44: 17–22.
3. PN-89/Z-04111/01. Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Postanowienia ogólne i zakres normy.

4. PN-89/Z-04111/02. Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.
5. PN-89/Z-04111/03. Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby grzybów mikroskopowych w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.
6. PN-89/Z-04111/08, Ochrona czystości powietrza. Pobieranie próbek. Pobieranie próbek powietrza atmosferycznego (imisja) do badań mikrobiologicznych metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.
7. *Sabariego S., Guardia C., Alba F.*: The effect of meteorological factors on the daily variation of airborne fungal spores in Granada (southern Spain). *Int. J. Biometeorol.* 2000, 44, 1–5.
8. Wytczne projektowania szpitali ogólnych. Biuro Projektów Służby Zdrowia, Warszawa 1984.

Otrzymano: 2002.12.17