

ADAM KROGULSKI

METODY OZNACZANIA OGÓLNEJ LICZBY BAKTERII W POWIETRZU ATMOSFERYCZNYM I WEWNĄTRZ POMIESZCZEŃ

METHODS OF DETERMINATION OF TOTAL CONCENTRATION OF BACTERIA IN ATMOSPHERIC AND INDOOR AIR

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

Polskie normy (PN) z 1989 r. dotyczące badań skażenia mikrobiologicznego powietrza atmosferycznego w dużym stopniu uległy dezaktualizacji, natomiast polskie norm dotyczące badania zanieczyszczeń biologicznych w pomieszczeniach wewnętrznych brak. Utrudnia to, a czasem uniemożliwia porównywanie uzyskiwanych wyników między sobą. W pracy pokazano na przykładach skalę problemu.

Słowa kluczowe: ogólna liczba bakterii, oznaczanie, metoda sedymentacyjna, metoda aspiracyjna zderzeniowa

Key words: total number of bacteria, measurement, sedimentation method, impact respiration method

WSTĘP

W Polsce brak aktualnych norm dotyczących oceny mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza. W efekcie w badaniach stosuje się różne metodyki. Najczęściej nie są one wystarczająco dokładnie opisane aby można było porównywać wyniki podane w różnych publikacjach. Aktualne wydania norm dotyczących pomiaru i oceny mikrobiologicznej czystości powietrza atmosferycznego pochodzą z 1989 roku [4-7]. Natomiast norm dotyczących metodyki pomiarów wykonywanych w pomieszczeniach zamkniętych brak. Są jedynie krajowe wytyczne projektowe [10] określające dopuszczalne stężenia mikroorganizmów w powietrzu wybranych pomieszczeń obiektów służby zdrowia. Mimo upływu ponad 20 lat w szpitalach nie wyposażonych w klimatyzację podane w nich parametry w większości pomieszczeń nie są możliwe do utrzymania (wyniki własne nie publikowane).

Obecnie sens prowadzenia badań zgodnie z cytowanymi normami jest problematyczny [3]. Za granicą nie ma powszechnie akceptowanych zaleceń metodycznych i ogólnie przyjętych wartości normatywnych. Istnieją zalecenia i propozycje organizacji narodowych, pozarządowych i niezależnych grup badaczy [2].

Z powodu braku w Polsce odpowiednich aparatów pomiarowych, w czasie tworzenia omawianych norm, na równych prawach dopuszczono wykonywanie pomiarów metodą sedymentacyjną i aspiracyjną zderzeniową. Obecnie metoda sedymentacyjna uważana jest za jeden z sposobów oceny zanieczyszczenia powierzchni przez mikroorganizmy znajdujące się w powietrzu.

Zgodnie z cytowanymi normami [4-7] do oznaczania ogólnej liczby bakterii w powietrzu należy używać agaru odżywczego, (pod tą nazwą dostępnych jest kilka podłoży różniących się między sobą). Obecnie na świecie zwykle do tego celu używa się podłoża TSA [9].

Opisana w wyżej wymienionych normach metoda aspiracyjna zakłada zatrzymanie bakterii z powietrza w płuczkach bełkotkowych. Z danych zawartych w normie PN-89/Z-04008/08 łatwo obliczyć że na jedną płytkę wysiewa się maksymalnie mikroorganizmy z 1,5 l powietrza. Oznacza to, że liczba kolonii na płytce może w wielu pomiarach wynosić zero lub kilka kolonii. Obecnie stosowane aparaty osadzają bakterie bezpośrednio na podłożu hodowlanym metodą zderzeniową (z szybkością 100 l/min.). Choć brak badań porównawczych wiadomo, że każda dodatkowa operacja (użycie płuczek) powoduje zaniżenie wyniku końcowego i zwiększa rozrzut wyników uzyskanych w kolejnych powtórzeniach.

Na wynik badania wpływają między innymi: rodzaj pożywki, sposób osadzenia bakterii na pożywce, temperatura inkubacji i liczba kolonii wyrosłych na płytce.

Dokładność wyniku zależy od: liczby powtórzeń osadzania bakterii z tej samej objętości powietrza w jednym punkcie pomiarowym i liczby kolonii na płytce.

Zbyt niska liczba kolonii na płytkach obniża precyzję uzyskanych wyników (wysoki stosunek odchylenia standardowego do średniej z powtórzeń). Zbyt wysoka liczba kolonii na płytkach mimo korekcy wyniku (uwzględniającej możliwość utworzenia jednej kolonii przez kilka komórek bakteryjnych) powoduje jego zaniżenie. W obu przypadkach błędy mogą wynosić ponad 100% wartości zmierzonej.

Celem niniejszej pracy było określenie zależności uzyskiwanych wyników od doboru podłoża, liczby kolonii rosnących na jednej płytce i metody osadzania na niej bakterii.

MATERIAŁ I METODY

P o d ł o ż a . 1) TSA –Tryptone soya agar f-my Oxoid o pH $7,3 \pm 0,2$ w temperaturze 25°C , bogate w składniki odżywcze podłoże, na którym rośnie wiele gatunków mikroorganizmów. 2) Agar odżywczy (wyciąg mięsny, pepton proteoze f-my Difco 1%, agar f-my Difco 1,5%, NaCl 0,5%. 3) PCA – Plate count agar (tryptone glucose yeast agar) f-my Oxoid o pH $7.0 \pm 0,2$. Podłoże zalecane do użytku w przemyśle mleczarskim.

A p a r a t u r a . 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 wykorzystują metodę aspiracyjną zderzeniową. MB 1 osadza materiał na płytkach typu Rodac \varnothing 55 mm. MAS-100 na powszechnie używanych w mikrobiologii płytkach \varnothing 90 mm. Oba aparaty posiadają głowice z otworami (dyszami). Powietrze przechodzące przez jeden otwór trafia w jeden osobny punkt na pożywce. Do korekcy wyniku zaniżonego w wyniku trafienia dwóch lub więcej cfu (jednostek tworzących kolonie) w jeden punkt wprowadza się poprawkę według wzoru *Fellera* [1]

Płytki z osadzonymi bakteriami inkubowano w temperaturze 30°C . Kolonie liczono po 48 godz. inkubacji.

Badania porównawcze, metodą zderzeniową i sedymentacyjną prowadzono w pokoju o wymiarach 3,7 x 5,0 i wysokości 4,1m. 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 (TSA, PCA, agarzem odżywcym) 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 TSA a następnie z PCA). Objętość zasysanego powietrza dobierano w taki sposób, aby liczba wyrosłych na płytkach kolonii bakterii 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-89/Z-04111/03 [6]. Wykonano również badanie metodą zderzeniową osadzając bakterie z powietrza atmosferycznego na podłożach: TSA i PCA.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki pomiarów prowadzonych metodą sedymentacyjną na podłożach: TSA, PCA i agarze odżywcym przedstawiono w tabelach I i II.

Tabela I. Ogólna liczba bakterii w powietrzu wewnętrznym. Metoda sedymentacyjna. Porównanie podłoży: TSA i agaru odżywczego
Total number of bacteria in indoor air. Sedimentation method. Comparison of results obtained on media: TSA and nutrient agar

Stężenie bakterii w powietrzu (cfu/m ³)	
TSA	Agar odżywczy
482,74	235,91
$\delta = 154,3$	$\delta = 110,9$

Objaśnienia: każda średnia jest policzona z 12 pomiarów. Różnice między podłożami są istotne statystycznie ($> 0,0002$); δ – odchylenie standardowe

Tabela II. Ogólna liczba bakterii w powietrzu wewnętrznym. Metoda sedymentacyjna. Porównanie podłoży: TSA i PCA
Total number of bacteria in indoor air. Sedimentation method. Comparison of results obtained on media: TSA and PCA

Stężenie bakterii w powietrzu (cfu/m ³)	
TSA	PCA
605,1	469,6
$\delta = 197,8$	$\delta = 147,6$

Objaśnienia: każda wartość stanowi średnią z 12 pomiarów. Różnice między podłożami są istotne statystycznie (0,04)

Na podłożu TSA bogatszym od agaru odżywczego wyrosło ponad dwukrotnie więcej bakterii. W porównaniu z PCA różnica w wynikach jest mniejsza lecz również istotna. Podłoże PCA jest zalecane do stosowania w obiektach przemysłu mleczarskiego. W porównaniu z TSA na podłożu PCA częściej rosną grzyby, co ogranicza jego przydatność w innych badaniach (szczególnie powietrza atmosferycznego).

Wyniki pomiarów prowadzonych na podłożach TSA i PCA, wykonywanych metodą aspiracyjną, w powietrzu atmosferycznym i wewnętrznym przedstawiono w tabelach (tab. III i IV).

Tabela III. Ogólna liczba bakterii w powietrzu wewnętrznym. Metoda aspiracyjna zderzeniowa. Porównanie podłoży: TSA i PCA
Total number of bacteria in indoor air. Impact aspiratory method. Comparison of results obtained on media: TSA and PCA

Lp.	Stężenie bakterii w powietrzu (cfu/m ³)	
	TSA	PCA
1	300,0	256,5
	$\delta = 70,36$	$\delta = 95,5$
2	528,1	462,3
	$\delta = 131,1$	$\delta = 132,5$

Objaśnienia: każda wartość stanowi średnią z 12 pomiarów. Różnice między podłożami nie są istotne statystycznie

Tabela IV. Ogólna liczba bakterii w powietrzu zewnętrznym. Metoda aspiracyjna zderzeniowa. Porównanie podłoży: TSA i PCA
Total number of bacteria in outdoor air. Impact aspiratory method. Comparison of results obtained on media: TSA and PCA

Stężenie bakterii w powietrzu (cfu/m ³)	
TSA	PCA
240,0	145,0
$\delta = 99,4$	$\delta = 94,1$

Objaśnienia: każda wartość stanowi średnią z 12 pomiarów. Różnice między podłożami są istotne statystycznie (0,01)

Jedynie w przypadku badania powietrza zewnętrznego wyniki na podłożu TSA były istotnie wyższe.

Przeprowadzone w względnie idealnych warunkach, w dużym (ponad 75 m³), zamkniętym od kilku godzin i pozbawionym wentylacji pomieszczeniu pomiary prowadzone metodą aspiracyjną i sedymentacyjną dają nie różniące się statystycznie wyniki (tabela V).

W badaniach prowadzonych metodą sedymentacyjną wyniki w znacznym stopniu zależą od ruchu powietrza. Aspiratory są o wiele mniej od niego zależne. Niektóre aspiratory posiadają wewnętrzny system pomiaru przepływu zasysanego powietrza.

Gwarantuje on uzyskanie prawidłowych wyników mimo intensywnego ruchu powietrza. Umożliwia to między innymi wykonywanie pomiarów w kanałach wentylacyjnych. Dzięki temu w odróżnieniu od metody sedymentacyjnej możliwe jest ich użycie do kontroli prawidłowego działania stacji uzdatniania powietrza oraz całych systemów klimatyzacyjnych.

Tabela V. Ogólna liczba bakterii w powietrzu wewnętrznym. Porównanie wyników uzyskanych metodą sedymentacyjną i aspiracyjną zderzeniową (TSA)
Total number of bacteria in indoor air. Comparison of results obtained sedimentation and impact respiratory methods (TSA)

Stężenie bakterii w powietrzu – TSA. (cfu/m ³)	
Sedymentacyjna	Aspiracyjna
406,3	475,1
$\delta = 171,9$	$\delta = 194,0$

Objaśnienia: każda wartość stanowi średnią z 12 pomiarów. Różnice między metodami nie są istotne statystycznie

Przy oznaczaniu liczby bakterii w wodzie za wiarygodne uznaje się wyniki, gdy liczba kolonii na płytkach o \varnothing 90 mm wynosi od 25 do 300 [1]. Przy osadzaniu bakterii z powietrza i inkubacji przez 48 h w 30°C otrzymuje się kolonie o silnie zróżnicowanej średnicy. Niektóre z kolonii zajmują obszar na którym osiadają bakterie przechodzące przez kilka otworów głowicy aspiratora. Inne kolonie stykają się. Jest to prawdopodobnie przyczyną że często już przekroczenie liczby 115 kolonii na płytce o \varnothing 90 mm powoduje istotne zaniżenie wyniku badania (tab. VI). Z analizy wyników badań prowadzonych przez kilka lat w naszym laboratorium wynika że, zbliżone wyniki (w cfu/m³) uzyskuje się najczęściej gdy liczba kolonii na płytkach mieści się między 20 a 70. W konkretnych badaniach górna granica podanego zakresu zależy między innymi od średnicy kolonii bakterii.

Tabela VI. Ogólna liczba bakterii w powietrzu wewnętrznym. Porównanie wyników z badań wykonanych w jednym pokoju równolegle, przy różnej liczbie kolonii na płytkach (seria A i B)
Total number of bacteria in indoor air. Measurements executed in same chamber parallelly. The results for different numbers of colony bacteriae on Petri-dishes (Series A and B)

A (TSA)					B (TSA)			
Lp.	obj. l.	l. kolonii 48 h	NPL	cfu/m ³	obj. l.	l. kolonii 48 h	NPL	cfu/m ³
1	100	58	63	630	300	122	145	483
2	100	71	78	780	300	128	154	513
3	100	65	71	710	300	112	131	437
4	100	63	68	680	300	103	119	397
5	100	64	70	700	300	132	160	533
\bar{x}		64.2	70	700		119	142	473
				$\delta = 54,31$				$\delta = 55,60$

Objaśnienia: NPL liczba kolonii po uwzględnieniu poprawki związanej z możliwością zassania dwu lub większej liczby komórek przez jeden otwór w głowicy aspiratora. Różnice między pomiarami przy różnej liczbie kolonii na płytkach są istotne statystycznie (0,0001)

Wielkość i szybkość wzrostu kolonii zależy między innymi od żywotności osadzanych komórek bakterii. Ta z kolei od temperatury i wilgotności powietrza oraz czasu przebywania w nim bakterii. Dlatego z wyjątkiem sytuacji gdy znamy przybliżoną liczbę bakterii w powietrzu (np. w przewodach klimatyzacyjnych), dopiero osadzenie na płytkach bakterii z co najmniej dwóch różnych objętości powietrza gwarantuje uzyskanie wiarygodnego wyniku.

WNIOSKI

1. Wykonane równolegle w ściśle kontrolowanych warunkach (brak ruchu powietrza) pomiary metodą aspiracyjną i sedymentacyjną dają wyniki nie różniące się istotnie.

2. Na agarze odżywczym i TSA istotnie różny % osadzonych bakterii tworzy kolonie.

3. Wpływ czynników takich jak rodzaj pożywki, metoda osadzania na niej bakterii i liczba kolonii na płytce jest na tyle duży na ostateczny wynik pomiaru, że musi być brany pod uwagę przy porównywaniu wyników badań wykonywanych różnymi metodami.

A. Krogulski

METHODS OF DETERMINATION OF TOTAL CONCENTRATION OF BACTERIA 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. 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 bacteria performed paralelly with: sedimentation and respiratory methods, three various media and clear different number of colony bacteria on Petri-dishes. Practical instructions concerned selection of measurements methods and interpretation of results are presented.

PIŚMIENNICTWO

1. *Feller W.*: An introduction to Probabilisty Theorie and its Applications. *John Wiley and sons, Inc.*, New York, 1950. p.175.
2. *Górny R.*: Biologiczne czynniki szkodliwe: normy, zalecenia i propozycje wartości dopuszczalnych. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* 2004, nr 3(41) 17.
3. *Krogulski A., Podsiadły T.*: Oznaczanie ogólnej liczby grzybów w powietrzu atmosferycznym i wewnątrz pomieszczeń. *Roczn. PZH* 2003, 54, 393.
4. PN-89/Z-04111/01. Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Postanowienia ogólne i zakres normy.
5. PN-89/Z-04111/02. Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.
6. 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.

7. PN-89/Z-04008/08. Ochrona czystości powietrza. Pobieranie próbek. Pobieranie próbek powietrza atmosferycznego (emisja) do badań mikrobiologicznych metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.
8. PN-ISO 8199:2001 Jakość wody – ogólne wytyczne oznaczania liczby bakterii metodą hodowli.
9. *Tai FC., Macher JM., Hung Y-Y.*: Concentrations of airborne bacteria in 100 U. S. Office buildings. Proceedings: Indoor Air 2002.
10. Wytyczne projektowania szpitali ogólnych. Biuro Projektów Służby Zdrowia, Warszawa 1984.

Otrzymano: 2005.11.10