

KONTROLA CZYSTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ POWIETRZA

Krzysztof KAISER
Andrzej WOLSKI



Powietrze jest środowiskiem nieprzyjaznym dla życia mikroorganizmów. W odróżnieniu od gleby i wody jest ono ośrodkiem okresowego przebywania mikroorganizmów, w którym nie mogą one dzielić się i rosnąć, lecz zachowują niestety swój potencjał infekcyjny.

Metody pomiaru zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza zostały rozwinięte już na początku XX wieku wraz ze wzrostem zagrożeń związanych z użyciem broni mikrobiologicznej [4]. W 1930 roku Stany Zjednoczone i Wielka Brytania posiadały już pierwsze urządzenia przeznaczone do wykrywania niebezpiecznych zarazków przenoszonych drogą powietrzną. W roku 1941 opracowano w Anglii stosowaną do dzisiaj metodę szczelinowo – zderzeniową.

Ze względu na bezpieczeństwo ludzi, w tym głównie pacjentów osłabionych chorobą i poddawanych zabiegom inwazyjnym, w pomieszczeniach szpitalnych ważne jest minimalizowanie ryzyka infekcji przenoszonych drogą powietrzną. Zachowanie czystości mikrobiologicznej powietrza w pomieszczeniach czystych szpitali jest bardzo istotne. W szczególności dotyczy to sal operacyjnych. Wzrost wymagań higienicznych w szpitalach, szczególnie w chirurgii głębokiej, wiąże się z koniecznością kontroli czystości mikrobiologicznej powietrza. Badania mikrobiologiczne powietrza są wskaźnikiem ułatwiającym utrzymanie instalacji klimatyzacji – wentylacji w stanie zapewniającym osiągnięcie wymaganej jakości powietrza.

1. METODY POMIAROWE CZYSTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ POWIETRZA

Wprowadzane normy czystości mikrobiologicznej powietrza wymagają wiarygodnych metod pomiarowych. Do wykrywania drobnoustrojów w powietrzu stosuje się metody: mikroskopowe, hodowlane i wiązane.

Metody mikroskopowe

Wykonanie tego typu badań wymaga przepuszczenia powietrza przez filtr membranowy, na którym osadzają się mikroorganizmy. Zastosowanie tutaj znajduje także szkiełko powleczone substancją lepka, np. wazeliną. Wyłapano mikroorganizmy barwi się, a następnie poddaje zliczaniu pod mi-

kroskopem. Metoda ta umożliwia wykrywanie w powietrzu nie tylko żywych, ale również martwych mikroorganizmów, w tym drobnoustrojów trudno wzrastających na pożywkach. Badanie pod mikroskopem umożliwia zaobserwowanie szerokiego spektrum zanieczyszczeń powietrza, zarówno zanieczyszczeń biologicznych, np. pyłków roślin, czy roztoczy, jak też zanieczyszczeń pyłowych. Za wadę tej metody uznaje się trudności w identyfikacji gatunkowej mikroorganizmów.

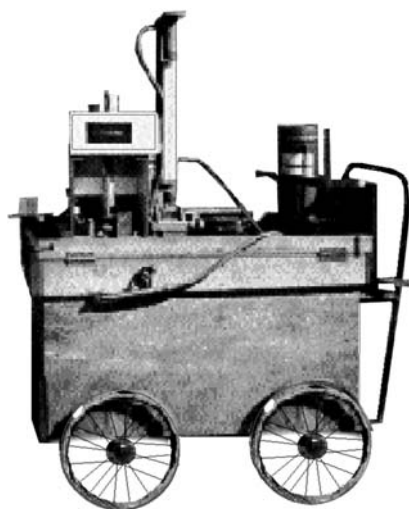
Metody hodowlane

Badania tego typu polegają na zebraniu mikroorganizmów zawartych w powietrzu na płytce z naniesioną pożywką. Następnie tak zebrane zarodki poddaje się inkubacji i zlicza wyrosłe kolonie. Kolonia może wyrosnąć z jednej lub z wielu połączonych komórek, co oznacza, że w powietrzu może znajdować się więcej mikroorganizmów niż wskazuje na to wynik wyrażony w JTK/m³. Wadą tej metody jest możliwość wykrywania komórek jedynie żywych i zdolnych do wzrostu na danej pożywce.

Metody wiązane są kombinacją dwóch poprzednich metod.

Do metod pomiarowych powszechnie stosowanych w metodach hodowlanych, ze względu na sposób pozyskiwania badanego materiału, zalicza się:

- metody sedymentacyjne,
- metody polegające na mechanicznym oddzieleniu zanieczyszczeń z próbki powietrza o standardowej



Rys. 1 Urządzenie do pobierania próbek zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza z 1940 r. [4]



Rys.2 Płytkę Petriego używaną do badania czystości mikrobiologicznej powietrza oraz widok kolonii mikroorganizmów wyhodowanych na płytce Petriego, pochodzących z powietrza wentylacyjnego [5, 6]

objętości: filtracyjne, zderzeniowe i odśrodkowe.

Metoda sedymentacyjna

Najstarszą, stosowaną jeszcze powszechnie w szpitalach metodą kontroli czystości mikrobiologicznej powietrza w salach operacyjnych jest metoda sedymentacji Kocha. W metodzie tej otwarte płytki z podłożem stałym należy pozostawić na 30 minut na wysokości 1 metra od podłogi. Do pobrania próbek polecane są płytki Petriego (rys.2) zawierające podłoża wzbogacone, np. Tryptic Soy Agar - TSA, TSA z neutralizatorami, w zależności od potrzeb także podłoża wybiórcze np. Sabouraud. Zarodki powinny być inkubowane przez 48 godzin w temperaturze 37°C (TSA) lub przez 10 dni w temperaturze 28°C (Sabouraud). Po tym czasie wyhodowane kolonie należy zliczyć i zidentyfikować ich szczepy.

Obliczanie wyników opiera się na założeniu, że w ciągu 5 minut na powierzchni równej 1 m² osiada tyle drobnoustrojów, ile znajduje się ich w 1 m³ powietrza (w warunkach bezwietrznych i bez przeciągów) [1, 3]. Zgodnie z tymi założeniami stężenie zanieczyszczeń mikrobiologicznych w powietrzu można opisać wzorem:

$$k_R = \frac{n}{P} \cdot \left(\frac{5}{t_s} \right) \quad (1)$$

gdzie:

k_R – stężenie zanieczyszczeń mikrobiologicznych w [JTK/m³],

n – liczba kolonii wyrosłych na płytce,

P – powierzchnia płytki w [m²],

t_s – czas otwarcia płytki (czas se-

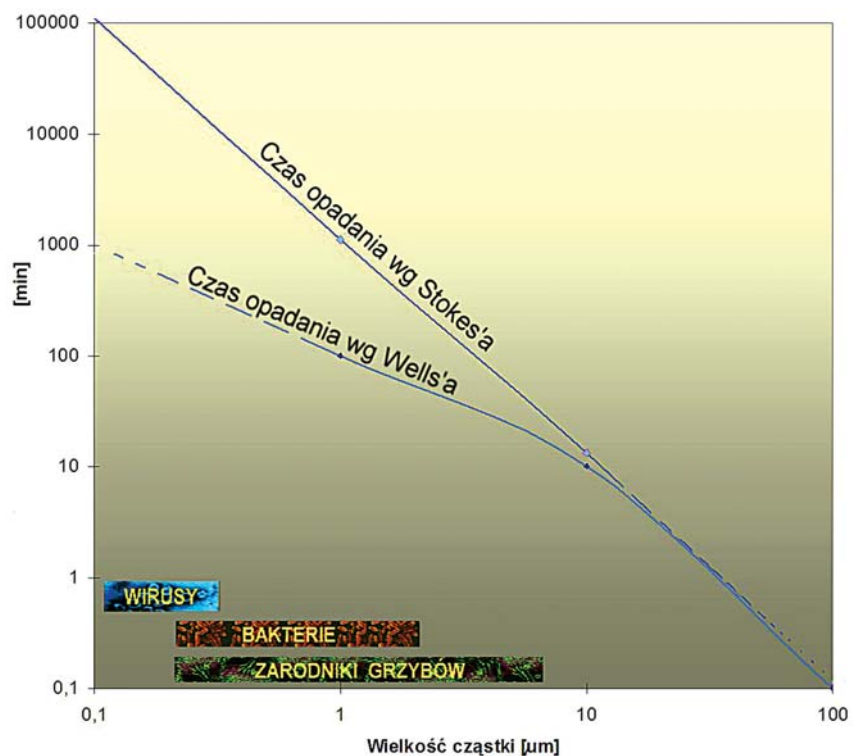
dymantacji) w [min], dla sal operacyjnych stosuje się czasy 30 - 60 minut.

Metoda sedymentacji posiada szereg wad. Za pomocą tej metody nie można wykryć np. najdrobniejszych cząstek bioaerozolu, które osiadają bardzo wolno lub w ogóle nie ulegają sedymentacji. Nie wszystkie mikroorganizmy, kropelki wody lub cząstki pyłu, na których znajdują się mikroorganizmy osadzają się z jednakową szybkością (rys.3). Z badań Wellsa wynika, że cząsteczki o średnicy 1 μm i mniejszej nie podlegają sedymentacji w pomieszczeniach, gdzie istnieją liczne prądy powietrza.

Dla wielu cząstek, szczególnie tych o małych rozmiarach, przedstawiona zależność (1) nie jest prawdziwa, ponieważ szybkość osadzania zależy od wielu czynników, takich jak: rozmiary, waga, ładunek elektrostatyczny, wilgotność, ruch powietrza, itd.. Stosunkowo duże prędkości powietrza występujące w obszarach pomieszczeń klimatyzowanych mają duży wpływ na szybkość sedymentacji. Dlatego metoda ta może posłużyć jedynie do oszacowania prawdopodobnego stężenia mikroorganizmów w obszarach, w których ruch powietrza jest nieznaczny. Metoda ta nie może być wykorzystana np. do przeprowadzenia bardzo ważnych badań czystości mikrobiologicznej powietrza nawiewanego lub wywiewanego z uwagi na dużą prędkość powietrza w okolicy kratki lub nawiewów laminarnych. Zaletą metody sedymentacyjnej jest prostota, szybkość i niski koszt badania.

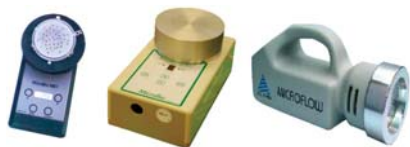
Metody polegające na mechanicznym oddzieleniu zanieczyszczeń z próbki powietrza o standardowej objętości

Z uwagi na poważne wady metody se-



Rys.3 Czas opadania cząstek o gęstości $\rho \approx 1g/cm^3$ z wysokości 2 m na podstawie badań Wellsa i Stokesa

dymantacyjnej, zastosowanie znalazły urządzenia pozwalające na mechaniczne oddzielenie zanieczyszczeń z pobranej próbki powietrza (rys.4).



Rys.4 Aparaty do kontroli czystości mikrobiologicznej powietrza pozwalające na mechaniczne oddzielenie zanieczyszczeń z pobranej próbki powietrza [8, 5, 9]

Przy pomocy tych urządzeń pobiera się określoną ilość powietrza, a jego zanieczyszczenia osiadają na filtrze lub bezpośrednio na pożywce. Pobrane przez urządzenie pomiarowe powietrze zawiera wszystkie zanieczyszczenia niezależnie od ich właściwości fizykochemicznych oraz warunków panujących podczas prowadzenia pomiarów, takich jak przewiewy, wymuszony przez wentylację ruch powietrza, itp.. Jednak nie wszystkie zanieczyszczenia są wychwytywane w urządzeniu z jednakową skutecznością. W praktyce stosuje się trzy metody wychwytu zanieczyszczeń z pobranej próbki powietrza.

Metoda filtracyjna polega na przepuszczeniu próbki powietrza przez filtr, na którym zatrzymują się zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Po przeniesieniu na powierzchnię pożywczego agar, poddaje się je inkubacji i zliczaniu liczby kolonii. Należy pamiętać, że niewłaściwy wybór urządzenia filtrującego lub wydłużenie ekspozycji może wpłynąć na zmniejszenie żywotności niektórych mikroorganizmów wskutek ich wysuszenia. Metodę tę również stosuje się w metodach mikroskopowych. Rutynowo znajduje ona zastosowanie w wykrywaniu endotoksyn w powietrzu.

Metoda zderzeniowa polega na przepuszczeniu próbki powietrza przez szczeliny lub otwory, nadające mu prędkość wystarczającą do wydzielenia zanieczyszczeń podczas uderzenia o powierzchnię pożywki znajdującej się na specjalnej, dostosowanej do miernika

płytkę podobnej do płytki Petriego, np. płytkę typu Rodac. Następnie zainfekowaną pożywkę poddaje się inkubacji i zlicza liczbę kolonii. Wadą tej metody jest możliwość zarastania pożywek w przypadku silnego zanieczyszczenia powietrza, a także spadek żywotności drobnoustrojów spowodowany stresem środowiskowym w wyniku nagłego uderzenia mikroorganizmu o pożywkę. Zarastanie pożywki może być również wynikiem nieodpowiednio przygotowanego podłoża, np. zbyt słabe osuszenie płytki i występowanie kropeł wody są przyczynami rozlewania się mikroorganizmów na pożywkę, w wyniku czego niemożliwe staje się późniejsze zliczanie kolonii. Podczas pobierania próbek, podobnie jak w metodzie filtracyjnej, przy dłuższej ekspozycji może dojść do wysychania podłoża, przez co zmniejsza się zdolność podłoża do zatrzymywania cząstek oraz następuje wysuszenie zebranych zarodków. Metoda ta nadaje się do kontroli powietrza na zawartość wirusów. Po wyplukaniu i zniszczeniu chloroformem innych mikroorganizmów, wyizolowane wirusy wprowadza się do hodowli komórkowych.

Metoda odśrodkowa polega na nadaniu powietrzu prędkości przez wentylator odśrodkowy, na obwodzie którego znajduje się pożywka w postaci paska z podłożem wychwytyjącym zanieczyszczenia. Następnie zainfekowaną pożywkę poddaje się inkubacji i zlicza liczbę kolonii. Metoda ta posiada podobne wady jak metoda zderzeniowa.

Wykrywanie wirusów, endotoksyn, toksyn i alergenów w powietrzu

Badanie na zawartość wirusów w powietrzu różni się zasadniczo od ww. metod stosowanych do badania bakterii i grzybów. Przede wszystkim niezbędne jest pobranie bardzo dużej ilości powietrza (powyżej 1000 dm³) [2], gdyż wirusy występują w nim niezbyt licznie, a znaczna ich część jest niezdolna do wywołania infekcji. Ilość pobieranego powietrza jest przynajmniej o rząd wielkości większa, niż ilość pobieranego powietrza w przypadku wychwytywania bakterii. Ze względu na

fakt, że wirusy mogą wzrastać jedynie w żywych komórkach, niezbędne jest zastosowanie hodowli tkankowych. Do tego celu najczęściej używa się tchawicy człowieka lub nerki małpy. Po wniesieniu do komórek wirusy namnażają się w nich, a po ich zniszczeniu przenoszą na sąsiednie, w wyniku czego pojawiają się tzw. łysinki (ang. plaque) na tle niezmiętej warstwy komórek. Liczbę wirusów zawartych w powietrzu podaje się jako liczbę jednostek tworzących łysinki, w skrócie pfu/m³ (plaque forming units).

Identyfikacja gatunkowa wirusów jest procesem żmudnym. Możliwe jest w tej metodzie wykrywanie wyłącznie wirusów infekujących zastosowane hodowle tkankowe.

Wykrywanie toksyn i alergenów występujących w powietrzu wymaga często żmudnych badań. Badanie na ich obecność opiera się przede wszystkim na wywoływaniu reakcji immunologicznej z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko znanym antygenom oraz badaniach chromatograficznych, np. w przypadku mikotoksyn. Wykrywanie endotoksyn występujących w powietrzu wymaga podjęcia następujących działań [2]: przefiltrowania powietrza przez filtr membranowy (z włókna szklanego lub PCV), rozcieńczenia odfiltrowanych komórek z preparatem z krwi skrzypłocza (morski stawonóg) z dodatkiem substancji chromogennej, wykonania pomiaru wytworzonej luminescencji.

2. DOKŁADNOŚĆ POMIARÓW

Jak wcześniej wykazano, mała dokładność pomiarów przy użyciu metody sedymentacyjnej sprawia, że metoda ta może służyć jedynie do oszacowania prawdopodobnego stężenia mikroorganizmów w obszarach, w których ruch powietrza jest nieznaczny. W przypadku pozostałych metod, dających wyniki niezależne od ruchu powietrza w badanym pomieszczeniu, dokładność pomiarów nie jest również zbyt duża. Szczególnie dotyczy to pomiarów prowadzonych w pomieszczeniach czystych, w których koncentracja zanieczyszczeń jest niska. Dokonanie wiary-

godnego pomiaru w takich warunkach wymaga przepuszczenia przez miernik dużej ilości powietrza, co może wywoływać wysuszenie wychwyconych mikroorganizmów i pożywki oraz zmniejszenie skuteczności wychwytywania zanieczyszczeń przez wysuszone podłoże. Również szczegóły konstrukcyjne mierników różnych producentów, takie jak np.: ilość i rodzaj otworów w mierniku zderzeniowym, czy prędkość powietrza zderzającego się z powierzchnią pożywki, mają znaczący wpływ na skuteczność wychwytu zanieczyszczeń powietrza. Dla przykładu na rysunku 5 przedstawiono wyniki pomiarów dokonanych równocześnie w tych samych warunkach środowiskowych przy użyciu kilku mierników różnych producentów.

Dla uniknięcia dużych błędów pomiarowych należy stosować normę jakości ISO 14698 dla pobierania próbek zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza i walidacji mierników. Walidacji miernika niestety nie może przeprowadzić użytkownik we własnym zakresie, dlatego przy zakupie należy zwrócić szczególną uwagę na to, czy producent przeprowadził walidację oferowanego miernika. Użytkownik wykonując badania czystości mikrobiologicznej powietrza powinien ściśle przestrzegać zaleceń producenta danego miernika.

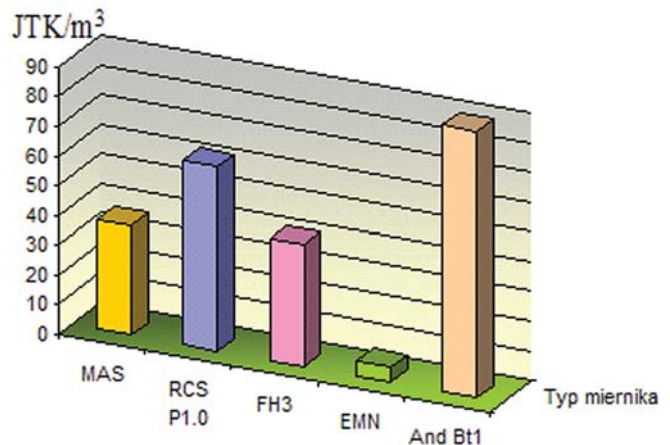
Prawidłowe przygotowanie podłoża jest czynnością bardzo ważną dla uzyskania wiarygodnych wyników. Niewłaściwie dobrany rodzaj podłoża, a także jego nieodpowiednie osuszenie i obchodzenie się z nim może być przyczyną uzyskania nieprawidłowych wyników badań, może też uniemożliwić identyfikację ilościowo – jakościową pobranych z powietrza mikroorganizmów. Na przykład zbyt długa ekspozycja płytki często jest przyczyną wysychania podłoża, natomiast nieodpowiednio osuszona płytka, na powierzchni której znajdują się kropelki wody, bardzo często zarasta. Należy pamiętać, że rodzaj podłoża, sposób przeprowadzania badania, czas poboru próbki, parametry fizyczne powietrza, a także warunki poboru próbek w znaczący sposób wpływają na żywotność mikroorganizmów. Od-

porność gatunkowa mikroorganizmów na tzw. stres środowiskowy również wpływa na otrzymane wyniki pomiarów. Otrzymywanie prawidłowych wyników badań wymaga rozważnej analizy, co do:

- oszacowania wielkości, wrazliwosci, zdolności do przeżycia i rodzaju przewidywanych zanieczyszczeń mikrobiologicznych,
- oczekiwanej koncentracji mikroorganizmów,
- doboru i przygotowania odpowiedniego podłoża,
- wybrania metody badawczej, urządzenia i miejsc pobierania próbek,
- doboru czasu trwania poboru próbki,
- warunków otaczającego środowiska,
- występujących zakłóceń i ich wpływu na badanie,
- intensywności zaburzeń przepływu powietrza.

Aspirator do badań czystości mikrobiologicznej powietrza powinien charakteryzować się:

- odpowiednią wydajnością ssania, zapewniającą pobór wystarczającej ilości biozanieczyszczeń powietrza w przypadku ich małych stężeń;
- szybkością przepływu powietrza przez urządzenie zapewniającą osadzenie się mikroorganizmów na pożywce;
- dużą dokładnością w wychwytywaniu mikroorganizmów;
- możliwością regulacji, umożliwiającą pobieranie próbek z różnych objętości powietrza;
- konstrukcją uniemożliwiającą zasysanie powietrza usuwanego z urządzenia;
- nieskomplikowaną obsługą i ła-



Rys.5 Wyniki pomiarów stężenia zanieczyszczeń mikrobiologicznych dokonanych równocześnie w tych samych warunkach środowiskowych przy użyciu kilku mierników różnych producentów. Na podstawie badań Reinmüllera [4]

twością jego czyszczenia, dezynfekcji i sterylizacji;

- odpornością materiałową na środki myjąco – dezynfekcyjne;
- możliwością jego zdalnego załączania i wyłączania.

Szczegółowe wymagania dotyczące metod kontroli czystości mikrobiologicznej powietrza znajdują się w normie ISO 14698.

3. BŁĘDY POMIAROWE

Istnieje wiele czynników mogących wywołać błędne wyniki pomiarów czystości mikrobiologicznej powietrza, np.: zła metoda pomiarowa, nieodpowiednia lokalizacja punktów pomiarowych, zakłócenie zjawiska przez eksperymentatora - emisja zanieczyszczeń przez osobę wykonującą pomiary, itd..

Stosowana procedura wykonywania pomiarów powinna minimalizować błędy pomiarowe i umożliwiać ich ocenę. Np. podczas badania czystości mikrobiologicznej nawiewanego powietrza, osoba badająca wprowadza podczas wykonywania pomiarów zanieczyszczenia, których wpływu nie można zaniedbać przy analizie wyników pomiarów. Pomimo założenia kompletnego, sterylne ubioru ochronnego i niezwyklej dbałości podczas wykonywania pomiarów dochodzi do zanieczyszczenia podłoża wzrostowego, co w efekcie daje wynik o kilka JTK/m³ większy od rzeczywistego stężenia zanieczyszczeń (rys.6, 7).



Rys.6 Pomimo kompletnego, sterylnego ubioru ochronnego i niezwyklej dbałości podczas wykonywania pomiarów dochodzi do zanieczyszczenia podłoża wzrostowego, co w efekcie daje wynik o kilka JTK/m³ większy od rzeczywistego stężenia zanieczyszczeń. Zdalnie uruchamiany miernik umożliwia zminimalizowanie wpływu eksperymentatora na wynik pomiaru [5]



Rys.7 Ubiór ochronny z aparatem oddechowym wyposażonym w filtr HEPA eliminuje zanieczyszczenie powietrza z dróg oddechowych eksperymentatora [7]

Do zanieczyszczenia podłoża dochodzi już przy umieszczeniu płytki z podłożem w mierniku (rys.8). Można to sprawdzić wykonując całą procedurę pomiarową z pominięciem samego pomiaru. Już samo umieszczenie i wyjęcie płytki z podłożem z aparatu może powodować jej zanieczyszczenie

wprowadzające błąd porównywalny z wielkością mierzoną.

Dla stwierdzenia wielkości błędów pomiarowych należy do serii płytek z podłożem poddanych ekspozycji dołączać płytki kontrolne, które wskażą nam to dodatkowo zainfekowanie płytek podczas manipulacji związanych z wykonywanymi pomiarami oraz płytki zupełnie nie używane dla sprawdzenia sterylności podłoża i ewentualnych zanieczyszczeń powstałych w laboratorium mikrobiologicznym.

Pomiary w okolicy nawiewów lub wyciągów można wykonywać metodą filtracyjną, zderzeniową lub odśrodkową. Stosując w tym przypadku metodę sedymentacyjną na pewno nie uzyska się wiarygodnych wyników ze względu na zbyt duże prędkości powietrza. Wątpliwe wyniki otrzyma się również stosując metodę sedymentacyjną do pomiarów prowadzonych wewnątrz sali z włączoną wentylacją. Ruch powietrza wewnątrz sali jest mniejszy niż przy nawiewach czy wyciągach, ale jest on wystarczający do zakłócenia grawitacyjnego opadania zanieczyszczeń powietrza, na którym oparta jest metoda sedymentacyjna. Błąd tej metody jest w tym przypadku trudny do oszacowania.

Wniosków o poziomie zanieczyszczeń mikrobiologicznych nie można wyciągać na podstawie jednego pomiaru. Z uwagi na dużą ilość czynników zakłócających pomiary i dużą zmienność zjawiska, konieczne jest okresowe wykonywanie serii pomiarów oraz zastosowanie analizy statystycznej dla określenia błędu pomiarowego.



Rys.8 Umieszczenie płytki z podłożem w aparacie i jej wyjęcie może powodować zanieczyszczenie wprowadzające błąd porównywalny z wielkością mierzoną [5]

LITERATURA:

- [1] Drewniak E. i T.: Mikrobiologia żywności, WSIP Warszawa 1999
- [2] Kołwzan B., Adamiak W., Grabas K., Pawełczyk A.: Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005
- [3] Marcinkowski J.T.: Podstawy higieny, Volumes Wrocław 1997
- [4] Möller Å. L.: Measurement of airborne micro-organisms – a long development still with problems. New cleanroom testing course attracts international interest, Sweden 2002
- [5] Materiały fotograficzne autorów
- [6] www.blygold.de
- [7] www.envirosafetyproducts.com/product.php
- [8] www.jsunitech.com/product/sampling/images/micro1.jpg
- [9] www.parrett.uk.com/mb1mb2.htm

