

Ilościowa i jakościowa kontrola szkodliwych czynników biologicznych w środowisku pracy¹

dr MAŁGORZATA GOŁOFIT- SZYMCZAK

e-mail: magol@ciop.pl

mgr ANNA ŁAWNICZEK-WAŁCZYK

dr hab. n. med. RAFAŁ L. GÓRNY

Centralny Instytut Ochrony Pracy –

Państwowy Instytut Badawczy

00-701 Warszawa

ul. Czerniakowska 16

Słowa kluczowe: środowisko pracy, szkodliwe czynniki biologiczne, bioaerazol, pomiary.

Keywords: working environment, harmful biological agents, bioaerosols.

Streszczenie

Szkodliwe czynniki biologiczne stanowią istotny problem medycyny pracy i zdrowia środowiskowego.

Przy podejrzeniu, że określona grupa pracowników jest narażona na działanie szkodliwych czynników biologicznych, które mogą powodować objawy chorobowe w tej grupie, należy zasadność takiego przypuszczenia potwierdzić przez wykrycie danego czynnika w środowisku pracy i określenie wielkości narażenia, a także przez bezpośrednie lub pośrednie stwierdzenie obecności czynnika biologicznego w organizmie chorego pracownika. Do wykrywania obecności czynników biologicznych w środowisku pracy i określenia rozmiarów narażenia, największe znaczenie ma badanie bioaerozoli. Istotne może być również mikrobiologiczne badanie próbek pyłu osiadłego,

materiału biologicznego pracowników oraz surowców.

W skali światowej brak jest ustalonych kryteriów oceny narażenia na czynniki biologiczne, jak również uznanych wartości normatywnych oraz zaleceń metodycznych. Warunki pobierania próbek powietrza na stanowiskach pracy w odniesieniu do mikroorganizmów i endotoksyn bakteryjnych zostały określone w normie polskiej PN-EN 13098: „Powietrze na stanowiskach pracy – Wytyczne dotyczące pomiaru mikroorganizmów i endotoksyn zawieszonych w powietrzu”.

W artykule dokonano przeglądu istniejących w piśmiennictwie przedmiotu sposobów ilościowej i jakościowej kontroli szkodliwych czynników biologicznych w środowisku pracy.

¹ Publikacja przygotowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach II etapu programu wieloletniego: „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” dofinansowanego w latach 2011-2013 w zakresie służb państwowych przez Ministerstwo Pracy i Polityki Społecznej. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

Summary

Harmful biological agents are an important problem of occupational medicine and environmental health. If there is a suspicion that a particular group of workers is exposed to harmful biological agents, which can cause disease symptoms in this group, the validity of this assumption should be confirmed by detecting a factor in the working environment and determining the level of exposure, directly or indirectly determining the presence of a biological agent in the worker who is ill. To detect the presence of biological agents in the workplace and to determine the magnitude of exposure, it is most important to study the bioaerosols. Microbiological testing of settled dust samples, biological material from workers and process

materials may also be relevant. On a global scale, there are no generally accepted criteria for assessing exposure to biological agents or generally accepted threshold limit values and methodological recommendations. In Poland, Standard PN-EN 13098 approved by the Polish Committee for Standardization (PKN) in 2002 (and replaced in 2007) "Workplace atmosphere. Guidelines for measurement of airborne microorganisms and endotoxin" determines the conditions of sampling workplace air in relation to microorganisms and bacterial endotoxins. This article reviews the existing literature on the subject of quantitative and qualitative methods of assessing harmful biological agents in the working environment.

WPROWADZENIE

Dorosły człowiek spędza prawie jedną trzecią swojego życia w pracy, gdzie jest narażony na szkodliwe oddziaływanie różnych czynników. W ostatnim dziesięcioleciu obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania biologicznymi czynnikami zagrożenia zawodowego, które są coraz częściej spostrzegane jako istotny problem medycyny pracy i zdrowia środowiskowego. Według Europejskiej Agencji Bezpieczeństwa i Zdrowia w Pracy, co roku w wyniku chorób zakaźnych na świecie umiera prawie 320 tys. pracowników, z czego około 5 tys. w państwach Unii Europejskiej. Stwarza to potrzebę podjęcia odpowiednich prac badawczych oraz działań dotyczących: rozpoznawania, monitorowania i prewencji określonych

czynników i wywoływanych przez nie chorób.

W państwach Unii Europejskiej kwestie dotyczące ochrony zdrowia pracowników przed ryzykiem związanym z ekspozycją na czynniki biologiczne w miejscu pracy zostały uregulowane szczegółowo w dyrektywie 2000/54/EC. W Polsce podstawowym aktem prawnym dotyczącym ochrony pracowników przed ryzykiem związanym z narażeniem na czynniki biologiczne w miejscu pracy jest rozporządzenie ministra zdrowia z dnia 22.04.2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki (DzU 2008 r., nr 48, poz. 288).

KRYTERIA OCENY ZAWODOWEGO NARAŻENIA NA CZYNNIKI BIOLOGICZNE

W odróżnieniu od większości czynników chemicznych i fizycznych, w skali światowej nie ma ustalonych kryteriów oceny narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne (SCB). Przy podejrzeniu, że określona grupa pracowników jest narażona na działanie jednego lub kilku czynników biologicznych, mogących powodować objawy chorobowe w tej grupie, należy zasadność takiego przypuszczenia potwierdzić przez:

- wykrycie danego czynnika w środowisku pracy i określenie wielkości narażenia
- bezpośrednie stwierdzenie obecności czynnika biologicznego w organizmie chorego pracownika, najczęściej przez posiew badanego materiału klinicznego (np.: krwi, moczu, kału, płwociny, wymazy z gardła, płynu mózgowo-rdzeniowego, punktu z węzłów chłonnych) na odpowiednie pożywki, rzadziej

przez sporządzenie preparatu mikroskopowego, wstrzyknięcie materiału klinicznego zwierzętom doświadczalnym lub zastosowanie takich bardzo czułych metod genetycznych, jak np. łańcuchowej reakcji polimerazy (*polymerase chain reaction*, PCR)

– pośrednie wykrycie kontaktu z tym czynnikiem przez stwierdzenie dodatniej reakcji immunologicznej pracownika na antygen danego czynnika (ma to znaczenie zarówno w ustaleniu czynnika wywołującego chorobę zakaźną, jak i alergiczną), najczęściej za pomocą: badania serologicznego (próbki surowicy krwi) testem immunoenzymatycznym (ELISA), aglutynacji, precypitacji w żelu czy radioimmunoabsorpcji (RAST).

Do wykrywania obecności czynników biolo-

gicznych w środowisku pracy i określenia rozmiarów narażenia, największe znaczenie ma badanie bioaerozoli. Istotne może być również mikrobiologiczne badanie próbek pyłu osiadłego: surowców (np. zboża, siana), gleby, odpadów, kompostu, nawozu, ścieków, wody i roślin, a także wymazów: ze ścian, z podłóg i mebli. Badanie to najkorzystniej wykonuje się metodą rozcieńczeń płytkowych polegającą na posiewie szeregu rozcieńczeń danej próbki na pożywki agarowe. Badane próbki można przetestować również na obecność: endotoksyny bakteryjnej, mikotoksyn grzybiczych oraz drobnych roztoczy. Przy podejrzeniu choroby odzwierzęcej należy pobrać również materiał kliniczny od zwierząt (np. krew, mocz, kał, mleko, wycinek tkanki, zeszkobiny skóry), który poddaje się badaniom zgodnie z ogólnie przyjętą metodyką mikrobiologiczną.

METODY BADANIA BIOAEROZOLI W ŚRODOWISKU PRACY

Warunki pobierania w Polsce próbek powietrza na stanowiskach pracy w odniesieniu do mikroorganizmów (ich całkowitej liczby oraz liczby drobnoustrojów zdolnych do wzrostu) i endotoksyn bakteryjnych zostały określone w normie polskiej PN-EN 13098 przyjętej przez Polski Komitet Normalizacyjny (PKN) w 2002 r. (i zastąpionej w 2007 r.): „Powietrze na stanowiskach pracy – Wytyczne dotyczące pomiaru mikroorganizmów i endotoksyn zawieszonych w powietrzu”. W normie tej zawarto podstawowe definicje, podano zalecenia dotyczące pobierania próbek metodami wolumetrycznymi, dopuszczając możliwość oceny stopnia mikrobiologicznego skażenia powietrza przez oznaczenie składników komórek mikroorganizmów (endotoksyn, glukanów) oraz pierwotnych (np. ATP) i wtórnych (np. mikotoksyny) metabolitów.

Kolejnym aktem normatywnym jest przyjęta przez PKN w 2004 r. (i zastąpiona w 2006 r.) norma polska PN-EN 14031 „Powietrze na stanowiskach pracy – Oznaczanie endotoksyn zawieszonych w powietrzu”. Określono w niej wytyczne do oceny narażenia na endotoksyny obecne w powietrzu na stanowiskach pracy. W normie tej przedstawiono metody: pobierania, transportu, przechowywania i oznaczania tych immunologicznie reaktywnych składników bioaerozolu.

W czerwcu 2004 r. PKN uznał normę europejską „Powietrze na stanowiskach pracy – Przewodnik użytkowania i stosowania procedur do oceny narażenia na czynniki chemiczne i biologiczne” za normę polską PN-EN 14042 (norma została zastąpiona w 2010 r.). W normie tej zawarto wytyczne dotyczące procedur wyboru, zastosowania i obsługi przyrządów pomiarowych wykorzystywanych do pobierania czynników chemicznych i biologicznych na stanowiskach pracy w środowisku zewnętrznym oraz nieprzemysłowym środowisku wewnątrz. Omówiono zasady doboru procedur pomiarowych, charakterystyki działania przyrządów pomiarowych wraz z opisem metod pobierania oraz praktyczne zasady ich stosowania w pomiarach indywidualnych i stacjonarnych. W odniesieniu do szkodliwych czynników biologicznych przedstawiono metody pomiaru zawieszonych w powietrzu mikroorganizmów i endotoksyn z zastosowaniem: impaktorów, impingerów i poborników z filtrem.

W 2005 r. została przez PKN przyjęta (a w 2008 r. zastąpiona) norma polska PN-EN 14583 „Powietrze na stanowiskach pracy – Wolumetryczne urządzenia do pobierania próbek bioaerozolu – wymagania i metody badań”. Określono w niej wymagania i metody testowania służące wyznaczeniu sprawności mierników wo-

lumetrycznych używanych do szacowania bioaerozoli na stanowiskach pracy.

Obecnie w skali światowej nie istnieją powszechnie obowiązujące wartości dopuszczalnych stężeń mikroorganizmów. Wynika to przede wszystkim z faktu, iż:

- nie ma zadowalających danych określających relację między narażeniem na specyficzny mikroorganizm a niekorzystnym skutkiem zdrowotnym będącym wynikiem takiego narażenia
- nie jest możliwa identyfikacja specyficznego czynnika odpowiedzialnego za obserwowany niekorzystny skutek zdrowotny
- wrażliwość organizmu człowieka na dany mikroorganizm jest jego cechą indywidualną
- nie ma standardowych przyrządów pomiarowych, które z dużą fizyczną i biologiczną sprawnością pozwoliłyby na precyzyjną ilościową i jakościową ocenę obecności mikroorganizmów w badanym środowisku.

Większość dostępnych propozycji wartości dopuszczalnych stężeń szkodliwych czynników mikrobiologicznych została opracowana na podstawie klinicznego obrazu choroby powodowanej przez szkodliwe czynniki mikrobiologiczne, z uwzględnieniem jedynie obecności danego czynnika w określonym elemencie badanego środowiska bez wyznaczania limitów ilościowych dla wielkości stężenia czynnika w powietrzu. W piśmiennictwie przedmiotu istnieją liczbowo wyrażone propozycje wartości dopuszczalnych, które umożliwiają interpretowanie uzyskanych empirycznych

danych pomiarowych. Mają one zazwyczaj charakter wartości arbitralnych lub względnych/porównawczych.

W strategii tworzenia normatywów higienicznych dla mikroorganizmów kluczową rolę odgrywa stosowana metoda badawcza oraz kryteria: środowiskowe, źródła, jakościowe i ilościowe. Jeżeli brak jest możliwości wyznaczenia ścisłej relacji między dawką szkodliwych czynników mikrobiologicznych a skutkiem zdrowotnym wywołanym jego działaniem, wówczas przez wielokrotny pomiar stężenia tegoż czynnika można zbudować normatyw higieniczny, który pozwoli ocenić jakość (czystość/stożenie zanieczyszczenia) badanego środowiska, a przez to ustalenie, co dla danego środowiska jest: typowe i akceptowalne, a co jest: nietypowe i nieakceptowalne. Zaprezentowane powyżej podejście zwane filozofią środowiskową tworzenia normatywów higienicznych dla szkodliwych czynników mikrobiologicznych wydaje się być obecnie rozsądną alternatywą wobec podejścia zwanego klinicznym, wymagającego dość restrykcyjnie opisu relacji między dawką szkodliwego czynnika a odpowiedzią organizmu manifestującą się określonym skutkiem zdrowotnym (Górny i in. 2011).

W 2004 r. Zespół Ekspertów ds. Czynników Biologicznych Międzyresortowej Komisji ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy zaproponował przyjęcie zalecanych wartości dopuszczalnych stężeń najpowszechniejszych kategorii mikroorganizmów i endotoksyny bakteryjnej w powietrzu pomieszczeń (tab. 1.).

Tabela 1.

Propozycje zalecanych stężeń drobnoustrojów i endotoksyny w powietrzu pomieszczeń opracowane przez Zespół Ekspertów ds. Czynników Biologicznych (Augustyńska, Pośniak 2007; Górny 2004)

Czynnik mikrobiologiczny	Dopuszczalne stężenie	
	pomieszczenia robocze zanieczyszczone pyłem organicznym	pomieszczenia mieszkalne i użyteczności publicznej
Bakterie (razem)	$1,0 \cdot 10^5$ jtk/m ³ ^a	$5,0 \cdot 10^3$ jtk/m ³
Bakterie Gram-ujemne	$2,0 \cdot 10^4$ jtk/m ³ ^a	$2,0 \cdot 10^2$ jtk/m ³
Termofilne promieniowce	$2,0 \cdot 10^4$ jtk/m ³ ^a	$2,0 \cdot 10^2$ jtk/m ³
Grzyby	$5,0 \cdot 10^4$ jtk/m ³ ^a	$5,0 \cdot 10^3$ jtk/m ³
Czynniki z grupy 3. i 4. zagrożenia	0 jtk/m ³	0 jtk/m ³
Endotoksyna bakteryjna	200 ng/m ³ (2000 JE/m ³)	5 ng/m ³ (50 JE/m ³)

Objaśnienia:

jtk – jednostka tworząca kolonie; JE – jednostka endotoksyczna.

^a dla frakcji respirabilnej proponowane wartości powinny być o połowę mniejsze i powinny wynosić: $5,0 \cdot 10^4$ jtk/m³ dla bakterii mezofilnych; $1,0 \cdot 10^4$ jtk/m³ dla bakterii Gram-ujemnych; $1,0 \cdot 10^4$ jtk/m³ dla termofilnych promieniowców; $2,5 \cdot 10^4$ jtk/m³ dla grzybów.

W odniesieniu do powietrza zewnętrznego, w ocenie ilościowej czynników mikrobiologicznych w 2010 r. Zespół Ekspertów przyjął założenie, że stężenie poszczególnych składników bioaerozolu w powietrzu atmosferycznym nie powinno przekraczać wartości dopuszczalnych

stężeń dla powietrza w pomieszczeniach mieszkalnych, tj. w środowisku, w którym człowiek spędza większość czasu w ciągu życia. Proponowane wartości stężeń szkodliwych czynników biologicznych dla powietrza atmosferycznego przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2.

Propozycje oceny stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza atmosferycznego (Górny 2010)

Składnik bioaerozolu	Stopień zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego	
	akceptowalny	nieakceptowalny
Bakterie (razem)	$\leq 5,0 \cdot 10^3$ jtk/m ³	$> 5,0 \cdot 10^3$ jtk/m ³
Bakterie Gram-ujemne	$\leq 2,0 \cdot 10^2$ jtk/m ³	$> 2,0 \cdot 10^2$ jtk/m ³
Termofilne promieniowce	$\leq 2,0 \cdot 10^2$ jtk/m ³	$> 2,0 \cdot 10^2$ jtk/m ³
Grzyby	$\leq 5,0 \cdot 10^3$ jtk/m ³	$> 5,0 \cdot 10^3$ jtk/m ³
Czynniki z grupy 3. i 4. zagrożenia	0 jtk/m ³	0 jtk/m ³
Endotoksyna bakteryjna	≤ 50 JE/m ³	> 50 JE/m ³

Objaśnienia:

jtk – jednostka tworząca kolonie; JE – jednostka endotoksyjna.

METODY POBIERANIA CZĄSTEK BIOAEROZOLI

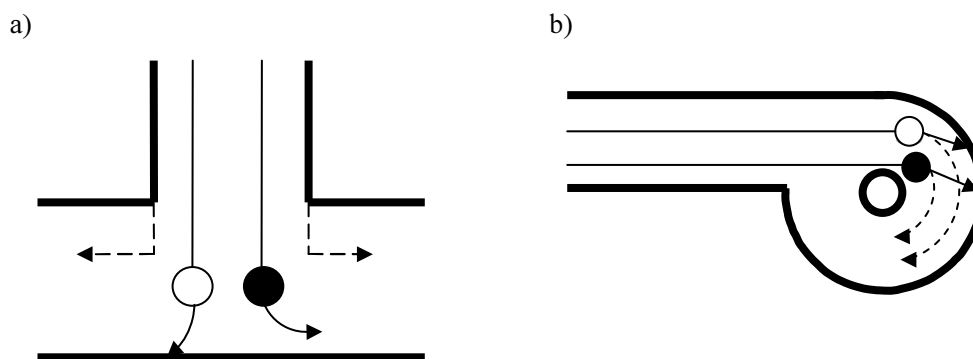
Metody pobierania cząstek bioaerozoli są determinowane przez ich fizyczne i biologiczne właściwości. Proces ten ma na celu wychwyt jak największej liczby cząstek biologicznych z powietrza, a następnie zgromadzenie ich (bez ich zmiany i uszkodzenia struktury) w taki sposób, by umożliwić późniejszą analizę. Współczesne wymagania techniczne badań mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza zalecają stosowanie metod wolumetrycznych, polegających na aktywnym pobieraniu próbki powietrza o określonej objętości (Górny 2010). Do pobierania próbek bioaerozoli najczęściej wykorzystuje się: metody zderzeniowe (impakcyjne), impingement czyli wychwyt cząstek do cieczy, metody filtracyjne oraz elektrostatyczne (Dutkiewicz, Górny 2002).

Impakcja

Impakcja jest jedną z najczęściej stosowanych metod pobierania próbek bioaerozoli. W celu separacji cząstek ze strumienia powietrza metoda ta wykorzystuje siłę bezwładności. Proces

impakcji zależy od takich właściwości inercyjnych cząstek, jak: ich wielkość, gęstość, prędkość oraz od takich parametrów fizycznych użytego impaktora, jak: wymiary dyszy/dysz oraz ich odległość od powierzchni wychwytu (determinujące prędkość przepływu strugi powietrza przez przyrząd pomiarowy), (Kulkarni i in. 2011; Macher 1999). W impaktorach strumień powietrza przechodząc przez otwór wlotowy przyrządu pomiarowego, ulega gwałtownej zmianie (najczęściej pod kątem 90°) co do kierunku swego ruchu (rys. 1a i 1b). W wyniku działania siły inercji cząstki o większej masie wypadają ze strugi powietrza na powierzchnię wychwytu, natomiast cząstki drobniejsze, nadal utrzymujące się w strudze, przechodzą wraz ze strumieniem powietrza na zewnątrz przyrządu lub kolejne piętra impaktora (Górny 2004). Wśród odmian impakcji stosowanych do wychwytu cząstek biologicznych z powietrza wyróżnia się:

- impakcję bezwładnościową
- impakcję wirową
- impingement, czyli impakcję do cieczy.



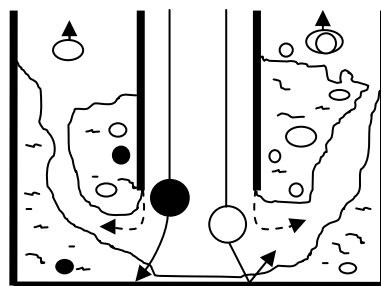
Rys. 1. Techniki pobierania bioaerozoli: a) impakcja bezwładnościowa, b) impakcja wirowa (Kulkarni i in. 2011; Macher 1999)

W metodzie wykorzystującej impakcję bezwładnościową cząstki wypadają ze strugi powietrza na skutek sił inercji i są deponowane na powierzchni wychwytu, np.: stałej pożywce mikrobiologicznej, szkiełku mikroskopowym lub taśmie pokrytej substancją o właściwościach adhezyjnych. Tego typu mechanizm wychwytu cząstek bioaerozoli znalazł zastosowanie m.in. w: jednostopniowych (np.: *surface air sampler*, MAS-100, impaktor N-6 Andersena) i wielostopniowych impaktorach (np. impaktor kaskadowy Andersena) czy aparacie szczelinowym Casella (Kulkarni i in. 2011; Macher 1999).

Metoda impakcji wirowej wykorzystuje inercję cząstek, które przed depozycją są wprawiane w ruch wirowy wewnątrz cylindrycznej komory. W aspiratorze wirowym powietrze jest pobierane do wnętrza głowicy przyrządu przez wirujący z dużą szybkością (4000 ÷ 5000 obr./min) cylinder. Wskutek działania siły odśrodkowej mikroorganizmy zostają zdeponowane na powierzchniach ścianek aparatu pokrytych paskami z warstwą

agaru (Kulkarni i in. 2011; Gutarowska 2002; Macher 1999). Impakcja wirowa jest wykorzystywana m.in. w poborniku wirowym Reutera.

Impingement, czyli impakcja do cieczy (rys. 2.) jest metodą polegającą na równoległej depozycji cząstek aerozolu w cieczy i ich dyfuzji w obrębie pęcherzyków tejże cieczy (Kulkarni i in. 2011). Najczęściej w metodzie tej stosuje się wodę jako medium wychwytyjące oraz cieczy o podobnej do wody lepkości lub cieczy nieparujące, których lepkość jest wielokrotnie większa od lepkości wody (np. „lekki” lub „ciężki” olej mineralny). Woda i cieczy do niej zbliżone dość szybko odparowują, dlatego stosując je, należy zredukować czas trwania pobierania próbki. Użycie cieczy o małym współczynniku parowania (np. glicerol) pozwala na wydłużenie czasu pobierania próbki aerozolu biologicznego (Macher 1999). Najpowszechniej stosowanymi impingerami są: AGI-4, AGI-30 oraz BioSampler (Duchaine i in. 2001; Dutkiewicz, Górny 2002).

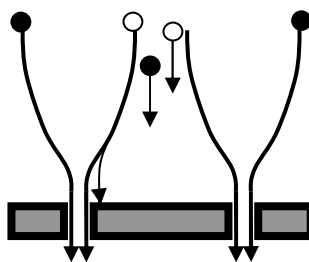


Rys. 2. Technika (impingement) pobierania bioaerozoli (Kulkarni i in. 2011; Macher 1999)

Filtracja

Filtracja jest definiowana jako proces separacji cząstek z powietrza, w którym są zawieszone, przez przepływ strugi przez porowate medium (filtr), (rys. 3.). Typowe filtry stosowane do pobierania próbek bioaerozolu są zazwyczaj cienkie (zwykle < 2 mm grubości) lub wielokrotnie uwarstwione, zawierając liczne pory o średnicy od 0,2 μm do 3 μm . Sprawność tego typu metody pobierania zależy od: fizycznych właściwości samych cząstek (ich średnicy aerodynamicznej), właściwości filtru (średnicy jego porów i uwarstwienia) oraz prędkości przepływu strugi (Macher 1999). Do najczęściej stosowanych filtrów w pomiarach bioaerozoli zalicza się filtry: poliwęglanowe, żelatynowe, teflonowe, z polichlorku winylu, z włókna szklanego,

octanu celulozy i mieszaniny estrów celulozy (Burton i in. 2007). W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie użyciem filtrów wykonanych z nanorurek węglowych (Guan, Yao 2010). Ze względu na swą prostotę, stosunkowo nieduże koszty i szeroki zakres zastosowań, filtracja jest powszechnie wykorzystywaną metodą pomiaru aerozoli biologicznych. Znalazła ona zastosowanie między innymi jako metoda kontroli zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza w instalacjach wentylacyjnych. Pobornik guzikowy (*btton personal inhalable aerosol sampler*), głowica GSP (*gesamtstaub – probenahmesystem*) oraz PAAS (*personal aeroallergen sampler*) są przyrządami działającymi na podstawie opisanej wcześniej metody (Ainzenberg i in. 2000; Macher 1999; Yamamoto i in. 2006).



Rys. 3. Technika filtracji pobierania bioaerozoli (Kulkarni i in. 2011; Macher 1999)

Elektrostatyczna precypitacja

W urządzeniach, w których zastosowano tego rodzaju sposób pobierania bioaerozolu, separacja cząstek ze strugi powietrza zachodzi wskutek elektrostatycznych oddziaływań. Znajdujące się w strudze powietrza cząstki bioaerozolu naturalnie obdarzone ładunkiem elektrycznym przepływają przez jonizator, gdzie zostają dodatkowo „doładowane” elektrycznie. Separacja tak naelektryzowanych cząstek wewnątrz

przyrządu pomiarowego jest uwarunkowana ich migracją i depozycją na odpowiednim medium (przystosowanym do późniejszej analizy) w silnym polu elektrycznym (Kulkarni i in. 2011; Han, Mainelis 2008; Mainelis i in. 2002; Parker, Plaks 2004; Yao, Mainelis 2006). Wykorzystanie naturalnych właściwości elektrostatycznych cząstek powoduje, że metoda ta jest określana jako „łagodna” i wysokosprawna technika pobierania bioaerozolu (Yao, Mainelis 2005; 2006).

ANALIZA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA AEROZOLI MIKROBIOLOGICZNYCH

Do wyznaczenia stężenia i składu gatunkowego mikroorganizmów w próbkach powietrza są

stosowane metody: mikroskopowe, hodowlane, metaboliczne i molekularne.

Metody mikroskopowe

Metody mikroskopowe polegają na bezpośrednim szacowaniu, w odpowiednio przygotowanych preparatach, liczby drobnoustrojów (np. spor grzybów) lub innych struktur biologicznych oraz obliczeniu ich zawartości w jednostce objętości powietrza. Próbkę powietrza są pobierane zwykle na szkiełko mikroskopowe podstawowe lub inne powierzchnie pokryte lepka substancją (np. wazeliną, mieszaniną żelatyny i gliceryny), (Dutkiewicz, Górny 2002; Dutkiewicz, Jabłoński 1989). Do tej grupy metod należy też często stosowana metoda mikroskopii epifluorescencyjnej (Heldal i in. 1996; Palmgren i in. 1989). Zaletą metod mikroskopowych jest rejestrowanie wszystkich mikroorganizmów, tj. żywych i martwych, natomiast wadą – brak możliwości precyzyjnej identyfikacji gatunkowej mikroflory, szczególnie bakterii (Dutkiewicz, Jabłoński 1989).

Metody hodowlane

Metody hodowlane pozwalają określić liczbę żywych i zdolnych do rozwoju drobnoustrojów w badanej objętości powietrza. Zgodnie z normą PN-EN-13098:2007, do hodowli różnych gatunków bakterii zaleca się stosowanie podłoża bogatego w składniki odżywcze, np. agaru odżywczego, agaru tryptonowo-glukozowego czy pożywki agarowej z hydrolizatem kazeinowo-sojowym. W celu zahamowania wzrostu grzybów na wymienionych podłożach w normie zaleca się dodawanie odpowiednich antybiotyków, np. cykloheksymidu. Do hodowli, namnażania i oznaczania ilościowego grzybów – zgodnie z wyżej wymienioną normą – jest polecany agar z ekstraktem maltozowym, agar z glicerolem i dichloranem z dodatkiem antybiotyków o wszechstronnym spektrum działania hamujących wzrost bakterii. Ważnym elementem w metodzie hodowlanej jest temperatura i czas inkubacji. Najczęściej zaleca się temperaturę $30 \div 37$ °C dla bakterii oraz $20 \div 27$ °C dla grzybów. Czas hodowli to zwykle $24 \div 48$ h dla bakterii oraz $5 \div 7$ dni dla grzybów (Dutkiewicz 1997).

Wynik pomiaru stężenia bioaerozolu wyraża się w jednostkach tworzących kolonie w 1 metrze sześciennym powietrza (jtk/m^3). Jednostka ta oznacza liczbę komórek lub agregatów komó-

rek drobnoustrojowych zdolnych do wzrostu na odpowiedniej pożywce agarowej w postaci oddzielnych kolonii. Metody hodowlane umożliwiają identyfikację izolowanych drobnoustrojów do szczebla rodzaju lub gatunku (Dutkiewicz, Górny 2002; Dutkiewicz, Jabłoński 1989; Jensen, Schafer 1998).

Metody metaboliczne i molekularne

W metodach metabolicznych i molekularnych, stężenie mikroorganizmów w powietrzu jest wyznaczane na podstawie wykrycia obecności produktów ich metabolizmu lub materiału genetycznego drobnoustrojów. Metody te są wykorzystywane m.in. do oznaczania w powietrzu stężenia: ergosterolu, endotoksyn, mikotoksyn, glukanów i kwasów tłuszczowych. W zależności od charakteru badanego czynnika stosuje się odpowiednie techniki analityczne, np. wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), gazowo-cieczową (GLC), cienkowarstwową (TLC) czy spektrofotometrię UV (Gutarowska 2002; Szponar i in. 2000). Metody metaboliczne oceniające zdolność mikroorganizmów do enzymatycznego rozkładu organicznych substratów (np. szereg biochemiczny API) lub analizujące metabolizm mikroorganizmów w odniesieniu do specyficznych źródeł węgla (np. system Biolog) znalazły zastosowanie w identyfikacji bakterii i grzybów. Bardzo często korzysta się z metod immunologicznych, opartych o stosowanie przeciwciał monoklonalnych, poliklonalnych czy markerów immunologicznych, które ujawniają obecność określonych grup lub szczepów drobnoustrojów.

Wykorzystywane są również techniki biologii molekularnej z użyciem komplementarnych sond fluorescencyjnych identyfikujących gen 16S rRNA, reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), które umożliwiają identyfikację pojedynczych gatunków mikroorganizmów, mikro-macierzy DNA (Jensen, Schafer 1998; Kalia i in. 2011; Kildesö, Nielsen 1997).

Metody molekularne mają istotną przewagę nad tradycyjnymi technikami, gdyż nie są uzależnione od hodowli mikroorganizmów na podłożach mikrobiologicznych. Pozwala to na zdecydowane przyspieszenie procedury badawczej. Metody oparte na analizie materiału genetycznego charakteryzują się: dużą czułością, powta-

rzalnością i bezpieczeństwem – metody te nie wymagają izolacji żywego czynnika infekcyjnego i mogą być przeprowadzone w chemicznie inaktywowanych próbkach (Murray i in. 2009).

METODY OZNACZANIA STĘŻENIA ENDOTOKSYNY BAKTERYJNEJ W POWIETRZU

Endotoksynę oznacza się powszechnie testem Limulus, w którym wykorzystuje się wywołane reakcją enzymatyczną zjawisko koagulacji krwi prymitywnego stawonoga morskiego skrzypłocza (*Limulus polyphemus*) w obecności minimalnych (rzędu 10^{-12} grama) ilości endotoksyny. W najprostszej wersji testu, próbkę powietrza pobraną na filtr membranowy poddaje się ekstrakcji w apirogennej wodzie destylowanej, a następnie sporządza się szereg rozcieńczeń, który inkubuje się w łaźni wodnej z komercyjnie dostępnym odczynnikiem *Limulus* – zliofilizowanym lizatem amebocytów skrzypłocza. Wytworzenie się skrzepu, który nie spływa po odwróceniu próbówki, jest dodatnim wynikiem testu. Po odczytaniu testu, za pomocą wzoru podanego przez producenta, oblicza się stężenie endotoksyny w aerogennym pyłu i w powietrzu. Test Limulus wykonuje się obecnie w różnych modyfikacjach, zwiększających czułość i powtarzalność metody. W większości są one oparte na spektrofotometrycznym odczycie barwnej reak-

cji enzymatycznej. Najbardziej wiarygodne wyniki daje metoda kinetyczna, w której jest rejestrowana szybkość biegu reakcji enzymatycznej w ciągu określonego czasu, a wynik oznaczenia uzyskuje się na podstawie komputerowej analizy prędkości tych zmian. W opisanym wcześniej teście dokonuje się pomiaru stężenia tylko tej endotoksyny, która jest aktywna w teście Limulus. Alternatywą dla tego testu metodą mierzącą stężenie całkowite endotoksyny bakteryjnej w powietrzu jest metoda polegająca na skojarzonym zastosowaniu chromatografii gazowej i spektrometrii masowej (GC-MS) do oznaczania 3-hydroksylowanych kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład cząsteczki endotoksyny i uznawanych za jej chemiczne markery. Jest to metoda kosztowniejsza, lecz dająca wiarygodne wyniki i co równie ważne, pozwalająca nie tylko na oznaczanie ilościowe, lecz także na charakterystykę jakościową endotoksyny (Ławniczek-Wałczyk, Górny 2010).

METODY OZNACZANIA INNYCH TOKSYCZNYCH SUBSTANCJI MIKROBIOLOGICZNYCH W POWIETRZU

W przeciwieństwie do endotoksyny bakteryjnej, metody służące do oznaczania innych immunotoksycznych związków chemicznych pochodzenia mikrobiologicznego nie znalazły jeszcze powszechniejszego zastosowania. Stężenie peptydoglikanu określa się na podstawie oznaczenia kwasu muraminowego metodą chromatografii gazowej i spektrometrii masowej (GC-MS) lub testem enzymatycznym przy wykorzystaniu jako substratu plazmy larwy jedwabnika (*silkworm larvae plasma test*, SLP). Obecnie (1→3)-β-D-glukany grzybicze oznacza się albo za pomocą

zmodyfikowanego testu enzymatycznego Limulus służącego do wykrywania endotoksyn bakteryjnych, albo wspomnianym wcześniej testem SLP lub przy zastosowaniu immunotestu (*inhibition enzyme immunoassay*, EIA). Próbkę powietrza służące do oznaczania mikotoksyn lub mikrobiologicznych lotnych związków organicznych (MLZO) pobiera się do pochłaniacza płynnego lub stałego (sorber węglowy lub filtr), a następnie oznacza metodami chromatograficznymi.

METODY OZNACZANIA STĘŻENIA SWOISTYCH ALERGENÓW W POWIETRZU

Stężenie swoistych alergenów roślinnych i zwierzęcych w powietrzu określa się, stosując metody immunologiczne. Schemat postępowania w tego typu badaniach obejmuje następujące etapy: a) przygotowanie surowic odpornościowych (np. chorych pracowników), skierowanych przeciw alergenom, które chcemy wykryć, b) pobranie próbek powietrza na stanowisku roboczym (najkorzystniej na filtr lub do cieczy) w celu oznaczenia zawartego w nim alergenu, c) wykonanie testu immunologicznego, określającego, na podstawie intensywności reakcji przeciwciała z

alergenem (użytym w formie zagęszczonego przesącza lub ekstraktu z filtru) jego stężenie w powietrzu. Najczęściej używa się do tego celu testu inhibicji radioimmunoabsorpcji RAST lub testu immunoenzymatycznego ELISA. Metody określania stężenia swoistych alergenów w powietrzu środowiska pracy, chociaż obecnie jeszcze dość drogie i skomplikowane, mają w przyszłości szansę na upowszechnienie z uwagi na ich wartość w prognozowaniu ryzyka alergii zawodowej w konkretnej grupie pracowników.

METODY POBIERANIA PRÓBEK Z ZANIECZYSZCZONYCH MIKROBIOLOGICZNIE POWIERZCHNI

Do najczęściej wykorzystywanych do pobierania próbek z zanieczyszczonych mikrobiologicznie powierzchni zalicza się następujące metody:

- odciskową z wykorzystaniem taśmy samoprzylepnej (dociśnięta do zanieczyszczonej mikrobiologicznie powierzchni taśma może być bezpośrednio przeniesiona na szkiełko mikroskopowe i poddana analizie; stosuje się ją do płaskich i gładkich powierzchni)
- wymazów (sterylny wacik zwilżony odpowiednim płynem, np.: sterylną wodą, solą fizjologiczną czy wodą peptonową – służy do zebrania zdeponowanych na skażonej powierzchni mikroorganizmów; zebrane mikroorganizmy zawieszają się w większej objętości płynu – zwykle identycznego z tym zastosowanym do pobrania próbki – i laboratoryjnie opracowuje tak zebrany materiał metodą seryjnych rozcieńczeń; technikę tę sto-

suje się na pofałdowanych i porowatych powierzchniach)

- płytek kontaktowych/odciskowych (stosuje się specjalne płytki mikrobiologiczne typu RODAC wypełnione odpowiednim podłożem hodowlanym tworzącym menisk wypukły, zwykle o powierzchni styku nie mniejszej niż 20 cm², które dociska się przez kilka sekund do skażonej biologicznie powierzchni; bywa, że w tym samym celu jest stosowana taśma agarowa; tę technikę pobierania stosuje się do płaskich i gładkich powierzchni)
- odkurzania (materiał jest pobierany za pomocą odkurzacza na jednorazowe filtry bawełniane, na których jest najpierw oceniany gravimetrycznie, a potem poddawany analizie mikrobiologicznej metodą seryjnych rozcieńczeń; technikę tę można stosować do każdego rodzaju powierzchni).

INTERPRETACJA DANYCH POMIAROWYCH

W skład bioaerozoli wchodzi nie tylko mikroorganizmy żywe i zdolne do tworzenia kolonii, lecz także takie organizmy, które nie są zdolne do tworzenia kolonii, a także organizmy martwe. Te dwie ostatnie grupy mikroorganizmów stanowią znaczącą część całkowitej liczby mikroorganizmów,

ponieważ powietrze atmosferyczne nie stwarza dogodnych warunków do ich wzrostu i rozwoju.

Analiza laboratoryjna pobranych próbek bioaerozoli opiera się na analizie jakościowej i ilościowej aerozolu bakteryjnego oraz grzybowego. W ilościowym opisie bioaerozoli całko-

wite stężenie żywych mikroorganizmów określa się w jtk (jednostkach tworzących kolonie) w 1 m³ powietrza. Jednostka ta oznacza liczbę komórek lub agregatów komórek drobnoustrojowych zdolnych do wyrośnięcia na odpowiedniej pożywce agarowej w postaci oddzielnych kolonii i jest najczęściej stosowaną jednostką określającą narażenie na szkodliwe czynniki biologiczne. Natomiast do określenia całkowitego stężenia mikroorganizmów (żywych i martwych) w badanym powietrzu stosuje się metody mikroskopowe (wykorzystujące zjawisko fluorescencji) czy też techniki oparte na biologii molekularnej. Badanie poziomu całkowitego stężenia mikroorganizmów jest niezwykle ważne ze względu na obecność w bioaerozolu substancji i struktur pochodzenia drobnoustrojowego o działaniu immunotoksycznym, które pomimo śmierci komórek wykazują biologiczną aktywność. Rozpoznanie wysokokonserwatywnych struktur obecnych u większości mikroorganizmów jest sygnałem do rozpoczęcia obrony organizmu gospodarza (np.

człowieka). Struktury te określa się jako związane z patogenami wzory molekularne (*pathogen – associated molecular pattern*, PAMP), zaś wiążące je receptory nazywa się receptorami rozpoznającymi wzory (*pattern recognition receptors*, PRR). Najbardziej znanymi przykładami takich molekuł są: bakteryjny lipopolisacharyd LPS, peptydoglikan (mureina), kwasy tejchojowe, tejchuronowe i lipotejchojowe, lipoproteiny, bakteryjny DNA, mannan w ścianie komórkowej drożdży oraz glukany i chityna w ścianie grzybów. Dodatkowo obecność mikotoksyn oraz substancji, określanych jako VOCs, może prowadzić do patologicznej aktywacji systemu odpornościowego.

Wybór właściwej techniki poboru bioaerozoli oraz metody laboratoryjnej analizy zależy od rodzaju i poziomu stężenia bioaerozolu w badanym środowisku. W przypadku badania narażenia na alergen w środowisku bardziej przydatne jest określenie całkowitego stężenia mikroorganizmów (żywych i martwych).

PODSUMOWANIE

Szkodliwe czynniki biologiczne najpowszechniejsze zagrożenie w środowisku stwarzają, gdy są transportowane drogą powietrzno-pyłową lub powietrzno-kropelkową jako składniki bioaerozoli. W ocenie narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne największe znaczenie mają wyniki pomiarów stężenia: bakterii, grzybów i endotoksyn w powietrzu środowiska pracy. Warunki oceny narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne w środowisku pracy są w Polsce określone w normach polskich: PN-EN 13098, PN-EN 14031, PN-EN 14042 oraz PN-EN 14583.

Do pobierania próbek bioaerozoli najczęściej wykorzystuje się: metody zderzeniowe, impingement, czyli wychwyty cząstek do cieczy, metody filtracyjne oraz elektrostatyczne.

W interpretacji danych pomiarowych bioaerozoli wewnątrz powszechnie przyjętym sposobem jest

posługiwanie się wartościami stężeń mikroorganizmów żywych.

Obecnie w skali światowej nie istnieją powszechnie obowiązujące wartości dopuszczalnych stężeń mikroorganizmów. W 2004 r. Zespół Ekspertów ds. Czynniki Biologicznych Międzyresortowej Komisji ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynniki Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy zaproponował przyjęcie zalecanych wartości dopuszczalnych stężeń najpowszechniejszych kategorii mikroorganizmów i endotoksyny bakteryjnej w powietrzu pomieszczeń. Zalecenia te, stosowane już od kilku lat w Polsce, mogą być pomocne nie tylko przy ocenie narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne w środowisku pracy czy wewnątrz, lecz także przy podejmowaniu odpowiednich działań profilaktycznych i prewencyjnych w tych środowiskach.

PIŚMIENNICTWO

- Aerosol measurement: principles, techniques, and applications (2011) [Red.] P. Kulkarni, P.A. Baron, K. Willeke. New York, John Wiley and Sons, Inc.
- Aizenberg V., Grinshpun S.A., Willeke K., Smith J., Baron P.A. (2000) Performance characteristics of the Button Personal Inhalable Aerosol Sampler. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 61, 398–404.
- Augustyńska D., Pośniak M. (2012) Czynniki szkodliwe w środowisku pracy – Wartości dopuszczalne. Warszawa, CIOP-PIB.
- Bioaerosols: assessment and control (1999) [Red.] J. Macher. Cincinnati, American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
- Burton N.C., Grinshpun S., Reponen T. (2007) Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Ann. Occup. Hyg.* 51, 143–151.
- Duchaine C., Thorne P.S., Mériaux A., Grimard Y., Whitten P., Cormier Y. (2001) Comparison of endotoxin exposure assessment by bioaerosol impinger and filter-sampling methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2775–2780.
- Dutkiewicz J. (1997) Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard. *Ann. Agric. Environ. Med.* 4, 11–16.
- Dutkiewicz J., Górny R.L. (2002) Biologiczne czynniki szkodliwe dla zdrowia – klasyfikacja i kryteria oceny narażenia. *Med. Pr.* 53, 29–39.
- Dutkiewicz J., Jabłoński L. (1989) Biologiczne szkodliwości zawodowe. Warszawa, PZWL.
- Dutkiewicz J., Śpiewak R., Jabłoński L., Szymańska J. (2007) Biologiczne czynniki zagrożenia zawodowego. Klasyfikacja, narażone grupy zawodowe, pomiary, profilaktyka. Lublin, Ad punctum.
- Dutkiewicz J., Zapór L. (2007) Czynniki biologiczne. [W:] Ryzyko zawodowe. Metodyczne podstawy oceny. Warszawa, CIOP-PIB, 373–403.
- Górny R.L. (2004) Biologiczne czynniki szkodliwe: normy, zalecenia i propozycje wartości dopuszczalnych. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* 3, 17–39.
- Górny R.L. (2010) Aerozole biologiczne – rola normatywów higienicznych w ochronie środowiska i zdrowia. *Med. Środ.* 13, 41–51.
- Górny R.L., Cyprowski M., Ławniczek-Wałczyk A., Gołofit-Szymczak M., Zapór L. (2011) Biohazards in the indoor environment – a role for threshold limit values in exposure assessment. [W:] Management of indoor air quality. Taylor & Francis Group, London, 1–20.
- Guan T., Yao M. (2010) Used of carbon nanotube filter in removing bioaerosols. *J. Aerosol. Sci.* 41, 611–620.
- Gutarowska B. (2002) Przegląd metod oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza. [W:] Problemy jakości powietrza wewnętrznego w Polsce 2001. Warszawa, Wyd. Instytut Ogrzewnictwa i Wentylacji Politechniki Warszawskiej, 93–102.
- Han T., Mainelis G. (2008) Design and development of an electrostatic sampler for bioaerosols with high concentration rate. *J. Aerosol. Sci.* 39, 1066–1078.
- Heldal K., Skogstad A., Eduard W. (1996) Improvements in the quantification of airborne microorganisms in the farm environment by epifluorescence microscopy. *Ann. Occup. Hyg.* 40, 437–447.
- Jensen P.A., Schafer M.P. (1998) Sampling and characterization of bioaerosols. *NIOSH Manual of Analytical Methods* 1(15), 82–112.
- Kalia V.C., Mukherjee T., Bhushan A., Joshi J., Shankar P., Huma N. (2001) Analysis of the unexplored features of rrs (16S rDNA) of the Genus Clostridium. *BMC Genomics* 12, 18.
- Kildesø J., Nielsen B.H. (1997) Exposure assessment of airborne microorganisms by fluorescence microscopy and image processing. *Occup. Hyg.* 41, 201–216.
- Kotelko K., Sedlaczek L., Lachowicz T.M. (1984) Biologia bakterii. Warszawa, PWN.
- Ławniczek-Wałczyk A., Górny R.L. (2010) Endotoxins and β -glucans as markers of microbiological contamination – characteristics, detection and environmental exposure. *Ann. Agric. Environ. Med.* 17, 193–208.
- Mainelis G., Górny L.R., Reponen T., Trunov M., Grinshpun S.A., Baron P., Yadav J., Willeke K. (2002) Effect of electrical charges and fields on injury and viability of airborne bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 79, 229–241.
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. (2009) Mikrobiologia. Wrocław, Elsevier Urban & Partner.
- Palmgren U., Ström G., Blomquist G., Malmberg P. (1989) Collection of airborne microorganisms on nucleopore filters: estimation and analysis – CAMNEA method. *J. Appl. Bacteriol.* 61, 410–406.
- PN-89/Z-04111/02: Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną. Warszawa, Polski Komitet Normalizacyjny.
- 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. Warszawa, Polski Komitet Normalizacyjny.
- PN-EN 13098 (2007) Powietrze na stanowiskach pracy – Wytyczne dotyczące pomiaru zawieszonych w powietrzu mikroorganizmów i endotoksyn. Warszawa, Polski Komitet Normalizacyjny.
- PN-EN 14031 (2006) Powietrze na stanowiskach pracy – Oznaczanie zawieszonych w powietrzu endotoksyn. Warszawa, Polski Komitet Normalizacyjny.
- PN-EN 14042 (2010) Przewodnik użytkowania i stosowanie procedur do oceny narażenia na czynniki chemiczne i biologiczne. Warszawa, Polski Komitet Normalizacyjny.
- PN-EN 14583 (2008) Powietrze na stanowiskach – Wolumetryczne poborniki bioaerozolu – wymagania i metody testowania. Warszawa, Polski Komitet Normalizacyjny.
- Rozporządzenie ministra zdrowia z dnia 22.04.2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla

zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki (DzU 2005, nr 81, poz. 716 ze zm.: DzU 2008, nr 48, poz. 288).

Szponar B., Larson L., Miller J.D. (2000) Determination of microbial colonization in water-damaged buildings using chemical marker analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Indoor Air* 10, 13–18.

Yamamoto N., Hikono M., Koyama H., Kumagai K., Fujii M., Yanagisawa Y. (2006) A passive sampler for

airborne coarse particles. *J. Aerosol. Sci.* 37, 1442–1454.

Yao M., Mainelis G., An H.R. (2005) Inactivation of microorganisms using electrostatic fields. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3338–3344.

Yao M., Mainelis G. (2006) Utilization of natural electrical charges on airborne microorganisms for their collection by electrostatic means. *J. Aerosol. Sci.* 37, 513–527.