

Miron KALISZEWSKI¹, Maksymilian WŁODARSKI¹, Krzysztof KOPCZYŃSKI¹, Rafał LEWANDOWSKI², Ewa Anna TRAFNY², Dorota PALIJCZUK³, Dorota KAMIŃONEK³, Małgorzata SZPAKOWSKA², Aneta BOMBALSKA¹, Monika MULARCZYK-OLIWA¹, Mirosław KWAŚNY¹

e-mail: mkaliszewski@wat.edu.pl

¹ Instytut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna, Warszawa

² Zakład Mikrobiologii, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa.

³ Zakład Ochrony przed Skażeniami, Wojskowy Instytut Chemii i Radiometrii, Warszawa.

Zastosowanie fluorescencyjnego spektrometru cząstek (UVAPS 3314, TSI) do klasyfikacji aerozoli biologicznych

Wstęp

Oddychanie jest najważniejszą czynnością fizjologiczną człowieka. W każdej minucie wdychamy i wydychamy, zależnie od wykonywanej czynności, kilka lub kilkanaście litrów powietrza, a wraz z nim tysiące cząsteczek pyłu, kurzu oraz obojętnych i chorobotwórczych mikroorganizmów. Te ostatnie stanowią potencjalne zagrożenie. Patogenne mikroorganizmy działają podstępnie, a symptomy choroby pojawiają się nawet po kilku dniach. W tym czasie istnieje wielkie ryzyko infekowania kolejnych osób.

W ostatnich latach prowadzone są intensywne prace nad systemami monitoringu powietrza wykorzystującymi laserowo wzbudzoną fluorescencję. Zaletą tych urządzeń, w porównaniu z testami biochemicznymi i mikrobiologicznymi, jest możliwość wykrywania w powietrzu pojedynczych cząsteczek w czasie rzeczywistym. Dodatkowym atutem jest możliwość szacowania liczby cząsteczek znajdujących się w określonej objętości, ich średnicy aerodynamicznej, kształtu oraz właściwości fluorescencyjnych.

Mikroorganizmy są strukturami o bardzo zróżnicowanej budowie, kształcie, wielkości oraz składzie biochemicznym [1]. Niektóre z nich wykazują właściwości fluorescencyjne o charakterystycznych długościach fali wzbudzenia i emisji [2], co jest cechą pozwalającą na odróżnianie bioaerozoli od innych cząstek. Podstawowym elementem budulcowym żywych organizmów są białka. Maksima wzbudzenia i emisji tych związków przypadają odpowiednio w obrębie 280 i 330 nm. Innym fluoroforem występującym w wegetatywnych bakteriach jest zredukowany dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NADH) oraz ryboflawina. Komórki wykazujące wysoką aktywność biologiczną wykazują fluorescencję dla maksimów wzbudzenia i emisji odpowiednio około 340 i 460 nm [3]. Pasma wzbudzenia tych fluoroforów są stosunkowo szerokie, co umożliwia zastosowanie źródeł światła, których emisja jest przesunięta względem maksimum wzbudzenia fluoroforu. Na podstawie właściwości fluorescencyjnych oraz wielkości rozproszenia światła na komórkach konstruowane są urządzenia służące do wykrywania zanieczyszczeń powietrza i odróżniania patogenów od niegroźnych mikroorganizmów.

Materiały i metodyka

Spektrometr UVAPS 3314

Aerozole analizowano za pomocą fluorescencyjnego spektrometru cząstek firmy TSI (*Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer - UVAPS model 3314*). Urządzenie to umożliwia pomiar w czasie rzeczywistym średnicy aerodynamicznej, intensywności światła rozproszonego oraz fluorescencji aerozoli. Badany aerosol zasysany jest z zewnątrz poprzez dyszę, przy stałym przepływie 1 l/min. Wokół głównego strumienia tworzony jest płaszcz ochronny ze strumienia przefiltrowanego powietrza przepływającego z wydajnością 4 l/min. Układ taki zapewnia precyzyjne skierowanie bioaerozolu w wiązkę lasera. Sygnał pochodzący od rozproszenia światła na cząsteczkach detekowany jest za pomocą fotopowielacza. Pomiar średnicy aerodynamicznej polega na analizie czasu przelotu cząstki pomiędzy dwiema wiązkami lasera emitującego światło czerwone o długości fali 655 nm i mocy 30 mW.

Spektrometr UVAPS 3314 wyposażony jest dodatkowo w układ do pomiaru fluorescencji, który umożliwia wykrywanie cząstek zawierających określone fluorofory. Fluorescencja wzbudzana jest przy długości fali 355 nm, a emisja rejestrowana za pomocą fotopowielacza w zakresie 430 – 580 nm. Intensywność fluorescencji rejestrowana jest w 64 kanałach. Pierwszy z nich odpowiada brakowi fluorescencji, a 64. – wartości maksymalnej. Moment wyzwolenia impulsu lasera UV jest synchronizowany z czasem przelotu cząstki, co pozwala na precyzyjne trafienie cząstki wiązką światła i uzyskanie sygnału o najwyższej energii [4].

Zgodnie z założeniami producenta parametry dobrze są tak, aby możliwe było wzbudzenie fluorescencji dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH) będącego wskaźnikiem metabolicznej aktywności bakterii [4].

Aerozole biologiczne

Badania przeprowadzono w komorze rękawicowej produkcji *Plas-Labs (Model 830-ABB/Sp z 800-HEPA/D, Plas-Labs, Inc., Lansing, MI, USA)*. Przed wszystkimi doświadczeniami wnętrze komory jałowiono przez 60 minut przy użyciu lampy *Puritec LPS9 (Osram, GmbH, Augsburg, Germany)* generującej promieniowanie UVC o mocy 2 W. Następnie dokonywano wymiany powietrza wewnętrznego przy użyciu układu filtrów HEPA w ciągu 30 minut. Po ukończeniu doświadczeń wnętrze komory dezynfekowano za pomocą preparatu *Perasafe*.

Aerozole generowano z wysuszonych próbek za pomocą inhalatora medycznego wyposażonego w głowicę RF6. Zaletą techniki generowania aerozoli z suchych próbek jest aerosol składający się jedynie z badanych cząstek. W przypadku generowania z roztworów sygnał fluorescencji cząstek biologicznych zostaje zakłócony przez kropelki cieczy, w której są one zawieszone/rozpuszczone [5].

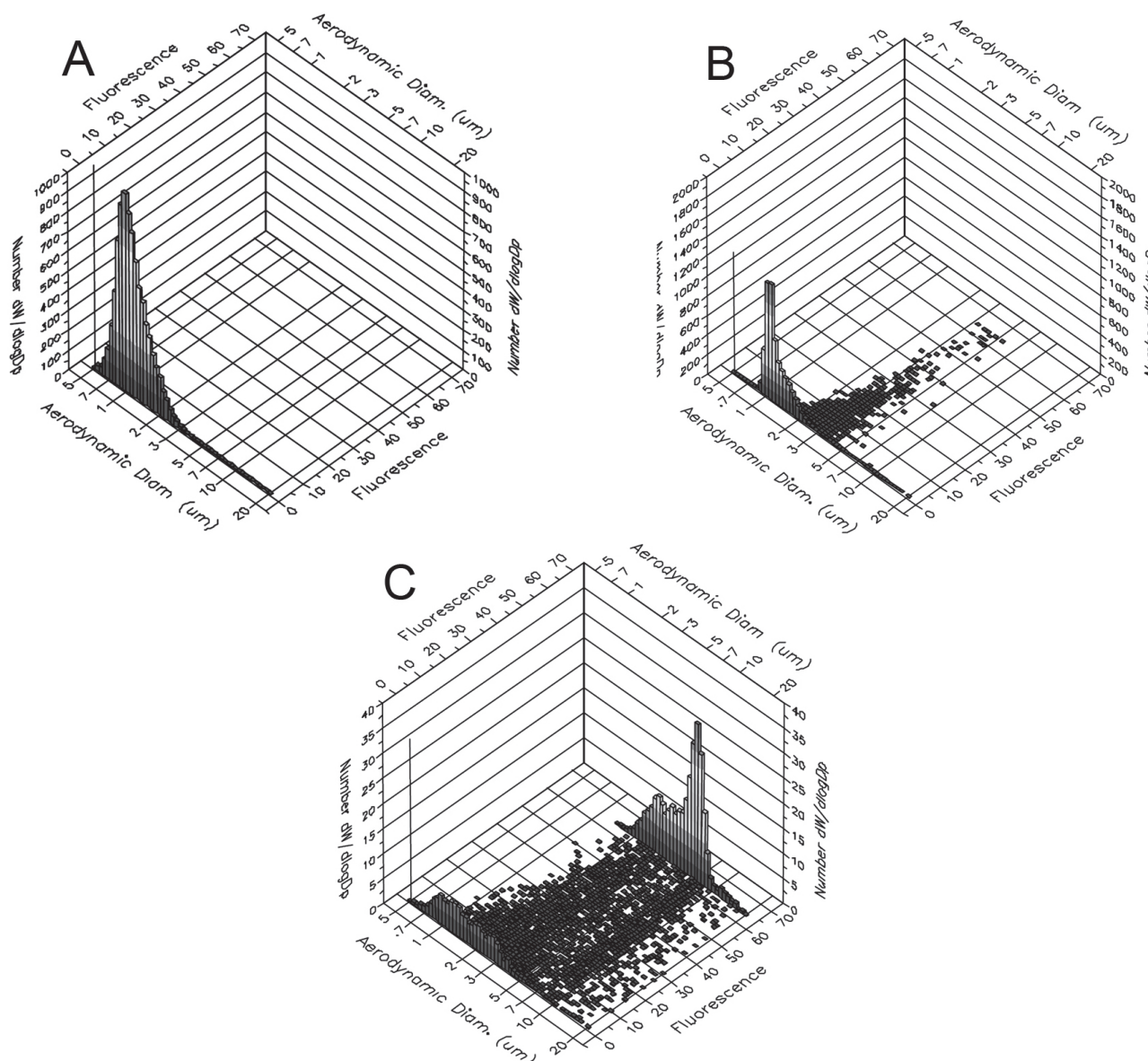
Metoda generowania z proszku daje zazwyczaj szeroki rozkład mierzonych średnic aerodynamicznych, gdzie obok pojedynczych cząstek powstają również agregaty. Jednak takiego rozkładu wielkości należy spodziewać się w przypadku potencjalnego ataku bio-terrorystycznego, z użyciem wysuszonych spor bakterii.

Pyłki roślin oraz *Syloid* pochodzący z ogólnodostępnych źródeł komercyjnych. Spory *Bacillus atrophaeus* (BGs) wyhodowano i liofilizowano w Zakładzie Mikrobiologii w Wojskowym Instytucie Higieny i Epidemiologii w Warszawie.

Wyniki i dyskusja

Podczas eksperymentów dane rejestrowane były cyklicznie z okresem całkowania dla pojedynczego pomiaru wynoszącym 30 sekund. Wynik był automatycznie zapisywany i rozpoczynany następny pomiar. Przykładowe rozkłady średnic aerodynamicznych i fluorescencji różnych aerozoli przedstawiono na rys. 1. Oś *X* przedstawia średnicę aerodynamiczną cząstek, oś *Y* – znormalizowaną koncentrację aerozolu ($dN/dlogDp$), zaś oś *Z* – fluorescencję poszczególnych cząstek w kanałach 1-64.

Syloid jest wzorcem niewykazującym fluorescencji, co widoczne jest na uzyskanym rozkładzie wielkości (Rys. 1 A). Większość cząstek ma wymiary od 0,7 do 3 μm , a przeciętna średnica aerodynamiczna wynosi około 1,5 μm .



Rys. 1. Rozkłady wielkości i fluorescencji aerozoli: A – Syloid (krzemionka) (SYL), B – Spory *Bacillus atrophaeus* (BGs), C – Pylak morwy papierowej (PAP)

W przeciwieństwie do cząstek krzemionki, bioaerazol wykazuje fluorescencję. Aerazol spor BG (rys. 1B) tworzy dwie frakcje z czego przeważająca część o średnicy około 1 μm nie wykazuje fluorescencji. Fluorescencja mniej licznej frakcji o średnicach 2–4 μm została zarejestrowana we wszystkich kanałach.

Odmienne rozkłady fluorescencji i wielkości cząstek uzyskano dla pyłku roślinnego (Rys. 1C). Zmierzone średnice aerodynamiczne obejmują cały zakres pomiarowy przyrządu, a najbardziej liczną frakcją stanowią cząstki o bardzo wysokiej fluorescencji rejestrowanej w ostatnim kanale.

Wnioski

Przedstawione rezultaty pokazują wyraźne różnice pomiędzy badanymi aerozolami. Cząstki pochodzenia biologicznego takie jak bakterie, spory, pyłki roślin czy grzyby, w przeciwieństwie do większości aerozoli nieorganicznych, wykazują fluorescencję. Stanowi to podstawę do monitoringu powietrza w czasie rzeczywistym. Zaprezentowana technika pomiarowa umożliwia szybkie klasyfikowanie aerozoli pod kątem rodzaju cząstek, jednak nie umożliwia ich dokładnej identyfikacji. W oparciu o uzyskane wyniki bezwzględne porównywanie aerozoli i ich klasyfikacja są bardzo trudne i wymagają zastosowania odpowiednich algorytmów i metod statystycznych. Obecnie prowadzone są intensywne prace umożliwiające scharakteryzowanie badanych substancji na podstawie danych uzyskanych z pomiarów.

Techniki pomiaru fluorescencji i rozmiaru pojedynczych cząstek umożliwiają monitoring powietrza w czasie rzeczywistym. Stała kontrola czystości mikrobiologicznej jest potrzebna szczególnie w miejscach użyteczności publicznej takich jak szkoły szpitale, centra handlowe i lotniska. Z uwagi na brak możliwości identyfikacji cząstek, monitoring może polegać na rejestrowaniu wszelkich zmian koncentracji cząstek pochodzenia biologicznego, względem tła. Informacja o pojawieniu się ewentualnego zagrożenia jest bardzo cenna dla ekip szybkiego reagowania, które zależnie od potrzeb mogą potwierdzić obecność patogennych mikroorganizmów za pomocą standardowych metod biochemicznych.

LITERATURA

- [1] A. D. Warth, D. F. Ohye, W. G. Murrell: J. Cell Biol. **16**, nr 3, 593 (1963).
- [2] P. P. Hairston, J. Ho, F. R. Quant: J. Aerosol Sci. **28**, nr 3, 471 (1997).
- [3] M. Was, P. Pollard: Water Res. **40**, nr 10, 2084 (2006).
- [4] Materiały firmy TSI. User's Manual. Model 3314, TSI. Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer Sensor. P/N 1933797, Revision F, March 2007.
- [5] M. Kaliszewski, M. Włodarski, R. Lewandowski, M. Kwaśny, K. Kopczyński, E. A. Trafny, M. Szpakowska, M. Mularczyk-Oliwa: Biuletyn WAT. **LIX**, nr 3, 659 (2010).

Praca sfinansowana z projektu badawczego zamawianego MNiSW-DBO-03-1/2007 oraz projektu badawczego własnego nr O N507 418840.