



Opracowanie parametrów generowania aerozoli bakteryjnych do badań przyrządem UVAPS

MIRON KALISZEWSKI, MAKSYMILIAN WŁODARSKI,
RAFAŁ LEWANDOWSKI¹, MIROŚLAW KWAŚNY, KRZYSZTOF
KOPCZYŃSKI, ELŻBIETA A. TRAFNY¹, MAŁGORZATA SZPAKOWSKA¹,
MONIKA MULARCZYK-OLIWA

Wojskowa Akademia Techniczna, Instytut Optoelektroniki,
00-908 Warszawa, ul. S. Kaliskiego 2

¹Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii,
Zakład Mikrobiologii, 01-163 Warszawa, ul. Kozielska 4

Streszczenie. W pracy przedstawione zostały wyniki wstępnych testów analizatora fluorescencji pojedynczych cząsteczek UVAPS 3314 firmy TSI. Celem pracy było testowanie unikalnej w skali kraju aparatury, określenie optymalnych dla pomiarów stężeń drobnoustrojów w aerozolu oraz metody generowania bioaerozoli. Badania wykazały, że wytwarzanie bioaerozolu z zawiesiny wodnej lub soli fizjologicznej w zamkniętej komorze powoduje powstawanie zbyt małego stężenia aerozolu bakterii w stosunku do całkowitej liczby cząstek. Efektem tego jest niemożność pomiaru fluorescencji przez przyrząd. Eksperymenty pozwoliły na wstępne oszacowanie możliwości pomiarowych UVAPS 3314.

Słowa kluczowe: fluorescencja bakterii, aerozole biologiczne, autofluorescencja.

Symbole UKD: 579.6

1. Wstęp

Zainteresowanie wpływem zanieczyszczeń powietrza na środowisko naturalne i zdrowie człowieka rośnie w miarę rozwoju cywilizacyjnego. Drobnoustroje znajdujące się we wdychanym powietrzu mogą wywoływać niekorzystne skutki zdrowotne. Z tego powodu olbrzymie znaczenie ma monitoring jakości mikrobiologicznej powietrza. Zagadnienie to jest zarówno w kręgu zainteresowań wojska jak i instytucji cywilnych, takich jak szpitale, szkoły i centra handlowe.

Drobnoustroje są strukturami złożonymi, w skład których wchodzi różnorodne biocząsteczki i związki chemiczne [1]. Część z nich wykazuje właściwości fluorescencyjne o charakterystycznych długościach fali wzbudzenia i emisji [2]. Na tej podstawie oparte jest wykrywanie aerozoli biologicznych. Wskaźnikiem metabolicznej aktywności bakterii jest zredukowany dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NADH). Obecność tego związku w komórkach charakteryzuje się maksimumami wzbudzenia i emisji odpowiednio 340 i 460 nm [3].

W ostatnich latach prowadzone są intensywne prace nad fluorescencyjnymi aerodynamicznymi miernikami cząstek (UVAPS). Zaletą tych urządzeń, w porównaniu z testami biochemicznymi i mikrobiologicznymi, jest zdolność wykrywania w powietrzu pojedynczych cząstek w czasie rzeczywistym. Dodatkowym atutem UVAPS jest możliwość szacowania liczby cząstek znajdujących się w określonej objętości, ich średnicy aerodynamicznej oraz właściwości fluorescencyjnych.

Pośród licznych publikacji dotyczących analizy bioaerozoli, jedynie znikoma ich liczba dotyczy badań za pomocą UVAPS. Ważnym elementem badań jest opracowanie metodyki generowania bioaerozoli. Opisane badania miały na celu określenie optymalnych warunków eksperymentalnych doboru stężeń zawiesin wyjściowych zawierających endospory laseczek z rodzaju *Bacillus* lub pałeczki Gram-ujemne oraz sposobu generacji bioaerozoli z uwzględnieniem UVAPS 3314 oraz standardowych technik mikrobiologicznych.

2. Materiały i metodyka

2.1. Aparatura

Analiza bioaerozoli wykonana została przy pomocy ultrafioletowego aerodynamicznego miernika wielkości cząstek firmy TSI, UVAPS model 3314. Urządzenie to umożliwia pomiar w czasie rzeczywistym średnicy aerodynamicznej, intensywności światła rozproszonego oraz fluorescencji aerozoli.

Cząsteczki analizowane są w komorze pomiarowej. Badany aerzol zasysany jest z zewnątrz przy stałym przepływie 1 l/min, poprzez dyszę. 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.

Sygnal pochodzący z rozproszenia światła na cząstce 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. Im cząstka jest większa, tym czas przelotu jest dłuższy.

Pomiar fluorescencji poszczególnych cząstek pozwala na odróżnianie materiału biologicznego od niebiologicznego. 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, 64 — wartości maksymalnej. Impuls lasera UV wyzwalany jest na podstawie pomiaru czasu przelotu, co pozwala uzyskać odpowiednią fluorescencję [4].

2.2. Materiał biologiczny

Badania przeprowadzono w komorze rękawicowej typ 830-ABB produkcji Plas-Labs (Model 830-ABB/Sp with 800-HEPA/D, Plas-Labs, Inc., Lansing, MI, USA) (rys. 1). Przed wszystkimi doświadczeniami wewnątrz 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.

Bioaerazol wytwarzano przy użyciu inhalatora pneumatycznego Monsun 2 MP2 (Medbryt, Warszawa) wyposażonego w głowicę typu RF6 o wydajności maksymalnej 0,48 ml/min (rys. 2) i średniej średnicy aerodynamicznej generowanych cząsteczek (MMAD) równej 1,4 μm (dane producenta dla pomiarów wykonanych na spektrofotometrze optycznym dla 0,9% NaCl).

Zawiesiny endospor laseczek z rodzaju *Bacillus* oraz pałeczek Gram-ujemnych rozpylano w komorze pomiarowej o objętości 500 dm³ za pomocą inhalatora medycznego (rys. 1 i 2). W czasie około 30-minutowej aerolizacji rozpylano 10 ml zawiesiny. Stężenie drobnoustrojów dobierane było eksperymentalnie. Etap ten decydował o przebiegu całego eksperymentu. Analiza bioaerozolu prowadzona była za pomocą różnych technik. Pomiar rozkładu wielkości oraz całkowitej liczby cząstek biologicznych przeprowadzono za pomocą UV-APS 3314. Liczbę drobnoustrojów oznaczano metodą rozcieńczeń i posiewu na płytkach z agarem LB lub agarem odżywczym i wyrażano jako CFU (*Colony Forming Units*).

TABELA 1

Badane materiały

Lp.	Drobnoustrój	skrót	CFU
1	endospory <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372	BGs	$2,77 \times 10^9$
2	endospory <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	BCs	$7,75 \times 10^8$
3	komórki wegetatywne <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	EC	$8,28 \times 10^8$
4	komórki wegetatywne <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	BS	$2,83 \times 10^6$
5	syloid FP 244	FP244	–
6	wzorzec fluorescencyjny B0200	B0200	–



Rys. 1. Rozpylanie bioaerozolu (z lewej w głębi przyrząd UVAPS)



Rys. 2. Rozpylanie bioaerozolu — widok głowicy nebulizatora

3. Wyniki i dyskusja

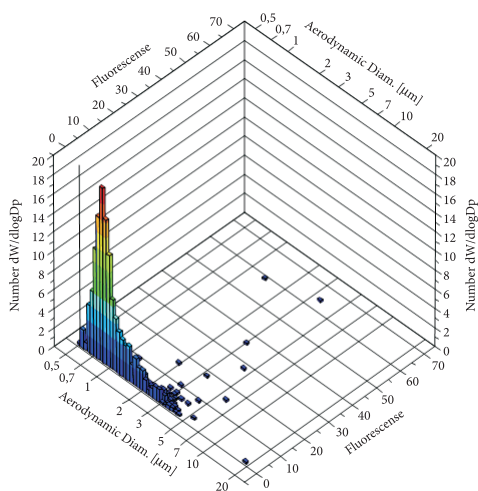
Pomiary miały na celu ustalenie optymalnych warunków wytwarzania i badania aerozoli biologicznych. Aerozole analizowano pod kątem:

1. Rozkładu wielkości cząstek, charakterystyki rozproszeniowej cząstek, charakterystyki fluorescencyjnej cząstek.
2. Kinetyki procesów rozpylania i opadania cząstek.

3.1. Charakterystyki wielkości, rozproszeniowe i fluorescencyjne cząstek

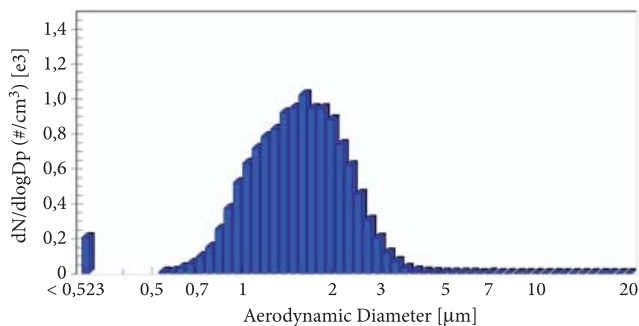
3.1.1. Powietrze

Na rysunku 3 przedstawiony został rozkład wielkości oraz poziom fluorescencji cząstek znajdujących się w laboratorium. Tylko niewielka liczba cząsteczek wykazuje fluorescencję. Jednoznaczne określenie rodzaju cząsteczek nie jest możliwe.

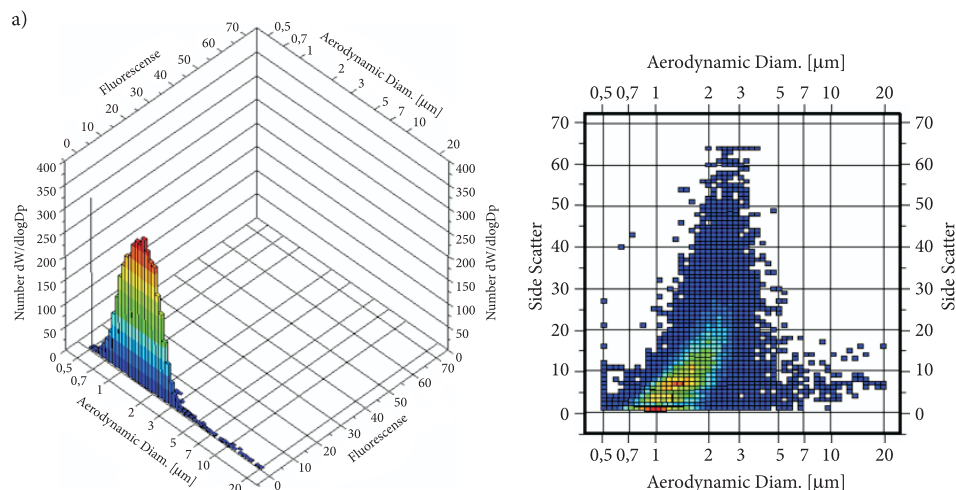


Rys. 3. Charakterystyka rozkładu wielkości i fluorescencji powietrza

3.1.2. Syloid



Rys. 4. Rozkład wielkości cząstek suchego aerozolu wytworzonego z Syloidu



Rys. 5. Charakterystyka rozkładu wielkości i fluorescencyjna (a) i zależność rozproszenia od wielkości cząstek (b) suchego aerozolu wytworzonego z Syloidu FP 244

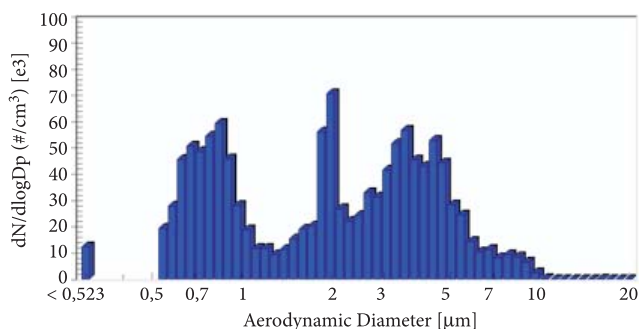
Syloid jest wzorcem niewykazującym fluorescencji w badanym zakresie, co widać na rysunku 5a. Większość cząstek ma wymiary od 0,7 do 3 μm , a przeciętna średnica aerodynamiczna wynosi około 1,5 μm . Zgodnie z wykresem (rys. 5b) istnieje niemal liniowa zależność pomiędzy średnicą aerodynamiczną a zdolnością rozpraszania światła. Jednak pewna liczba cząstek zachowuje się odmiennie. Wynik taki świadczyć może o zróżnicowanym kształcie lub powierzchni badanego aerozolu.

3.1.3. Fluorescencyjny wzorec wielkości — kulki lateksowe (B0200)

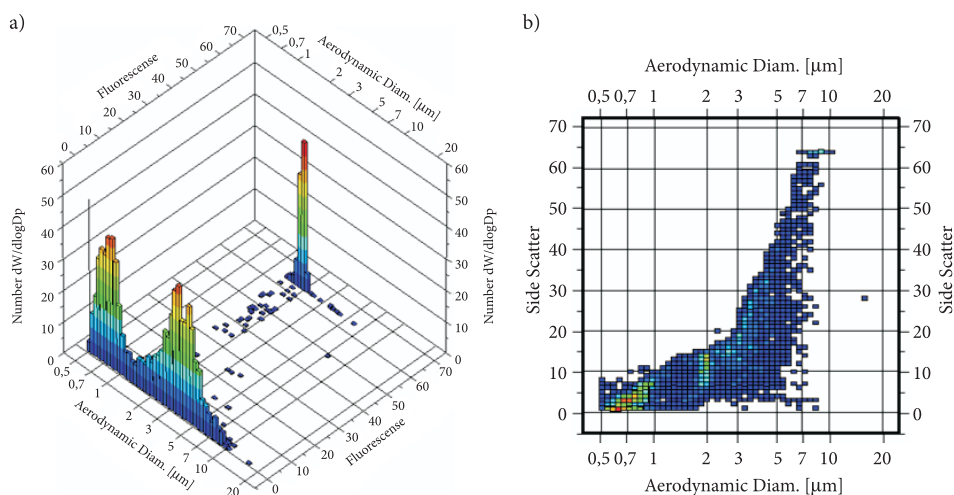
Charakterystyka aerozolu wytwarzanego z wodnej zawiesiny wzorca fluorescencyjnego przedstawiona została na rysunkach 6 i 7. Pik maksymalnej fluorescencji

odpowiada cząsteczkom o średnicy około 2 μm (rys. 7a). Wartość ta jest zgodna z danymi podawanymi przez producenta — 2,1 μm . Dwa pozostałe piki pochodzą od cząsteczek wody, w której zawieszony był wzorzec.

Wyniki przedstawione na rysunkach 5a i 7a wskazują, że przyrząd został skalibrowany tak, aby maksimum i minimum fluorescencji znajdowały się w skrajnych kanałach.



Rys. 6. Rozkład wielkości cząstek aerozolu wytworzonego z kulek lateksowych

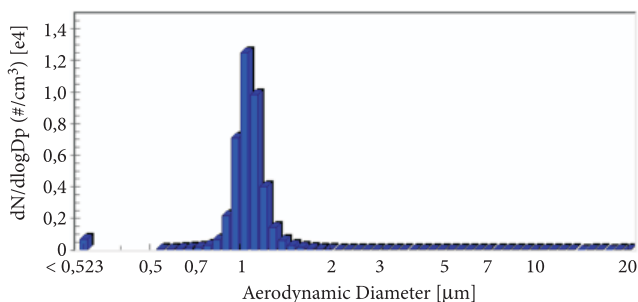


Rys. 7. Charakterystyka rozkładu wielkości i fluorescencyjna (a) i zależność rozproszenia od wielkości cząstek (b) aerozolu wytworzonego z fluorescencyjnych mikrokulek lateksowych o średnicy 2,1 μm

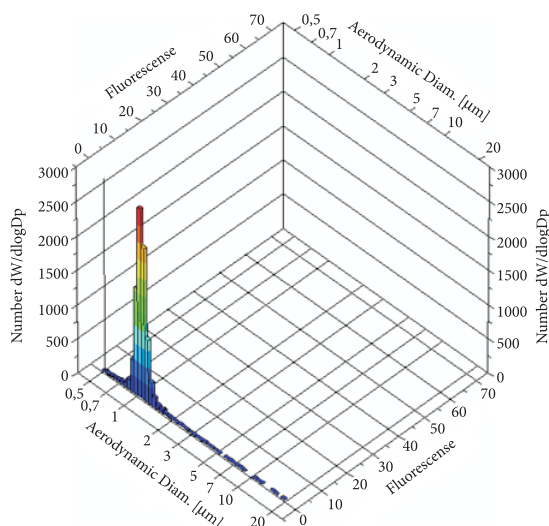
3.1.4. Aerozol BGs

Rozkład wielkości cząstek aerozolu wytworzonego z wodnej zawiesiny endospor *B. atrophaeus* przedstawiono na rysunku 8. W przeciwieństwie do aerozolu z kulek lateksowych uzyskano pojedynczy, wąski pik. Różnica ta wynika z innego sposobu wytwarzania aerozolu. Charakterystyka przedstawiona na rysunku 6 uzyskana

została przy pyleniu bezpośrednio przy wlocie aerozolu do miernika cząstek, co w rzeczywistości odpowiada charakterystyce cząstek wytwarzanych przez generator aerozoli. Natomiast pojedynczy pik widoczny (rys. 8) uzyskano podczas rozpylania z pewnej odległości od wlotu aerozolu. Jak wynika z wykresu, aerozol endospor BG nie wykazał fluorescencji (rys. 9).



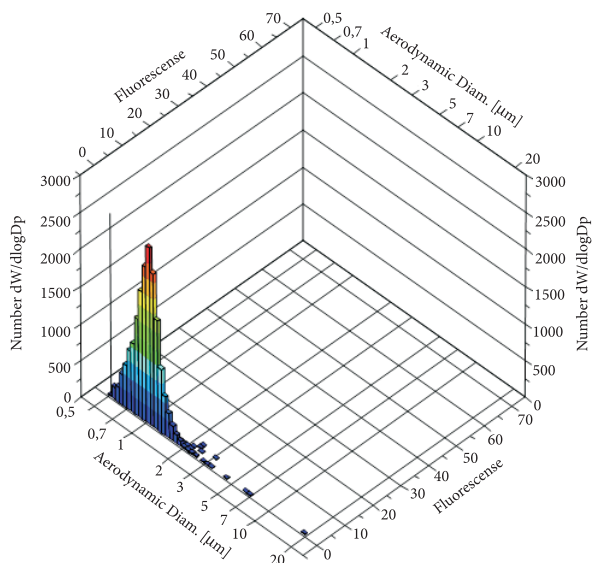
Rys. 8. Rozkład wielkości cząstek aerozolu wytworzonego z BGs



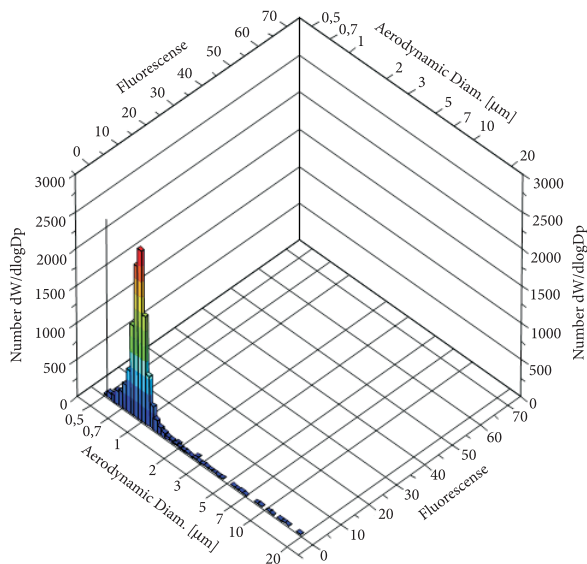
Rys. 9. Charakterystyka rozkładu wielkości i fluorescencyjna aerozolu BGs

3.1.5. Aerozol BS i EC

Poniżej przedstawiono charakterystyki bakterii *B. subtilis* (rys. 10) i *E. coli* (rys. 11). W praktyce mikrobiologicznej bakterie wegetatywne zawiesza się w soli fizjologicznej w celu zachowania izoosmotyczności. Zawieszenie w soli fizjologicznej spowodowałoby powstanie kryształków NaCl. Dlatego bakterie zawieszano w wodzie. Podobnie jak w przypadku spor nie wykazano fluorescencji.



Rys. 10. Rozkład wielkości cząstek i fluorescencji aerozolu wytworzonego z BS



Rys. 11. Rozkład wielkości cząstek i fluorescencji aerozolu wytworzonego z EC

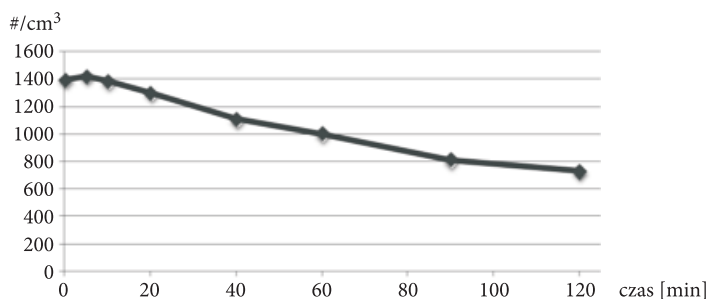
Zgodnie z założeniami producenta, UVAPS przeznaczony jest do wykrywania fluorescencji charakterystycznej dla wegetatywnych form mikroorganizmów. Powyższe rezultaty nie pozwalają jednoznacznie potwierdzić zdolności wzbudzenia fluorescencji. Uzyskany rezultat można interpretować w różny sposób: bakterie mogły nie wykazywać fluorescencji w tym zakresie na skutek zawieszenia w wo-

dzie, a tym samym w wyniku uszkodzenia ściany komórkowej. Inną przyczyną jest zbyt duże stężenie cząstek, co nie pozwala na uzyskanie pełnej mocy pojedynczego impulsu lasera UV. Interpretacja taka opisana została wcześniej w literaturze. Autorzy oszacowali dopuszczalną liczbę cząstek, przy której możliwe jest uzyskanie fluorescencji, na 60 \#/cm^3 [5]. W swoich badaniach Agranowski i wsp. uzyskali niewielką fluorescencję B, na poziomie 10% maksymalnej wartości. Wynik taki nie został potwierdzony w naszych badaniach. Prawdopodobną przyczyną jest stosowanie innej techniki wytwarzania aerozoli. Agranowski i wsp. osuszali generowany aerosol w strumieniu suchego powietrza. W niniejszej pracy rozwiązanie takie nie było możliwe, a wytworzony aerosol tworzył widoczną chmurę.

3.2. Zmiany stężenia cząstek podczas rozpylania i opadania

3.2.1. Aerosol BGs

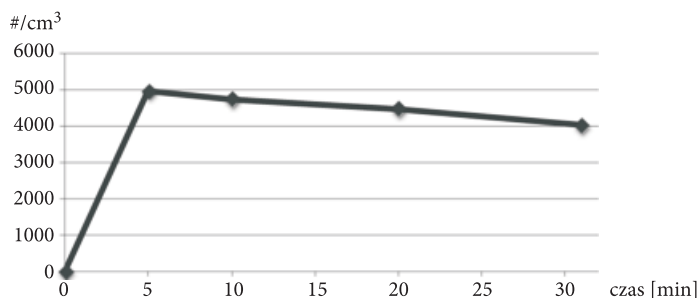
Zmiana stężenia cząstek aerozolu w czasie charakteryzowała się niemal liniową zależnością (rys. 12). Podczas 120 minut opadło około 50% cząstek.



Rys. 12. Zmiany stężenia cząstek podczas opadania aerozolu BGs

3.2.2. Aerosol BCs

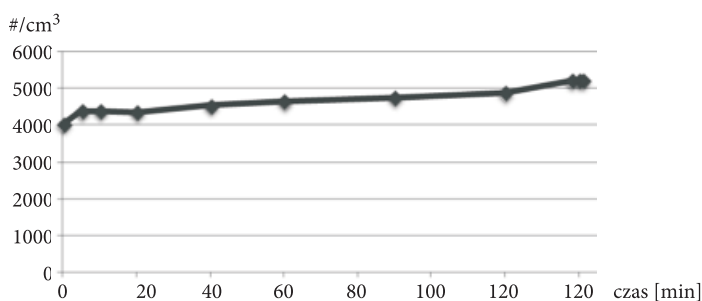
Zmiany stężenia cząstek podczas rozpylania BCs przedstawione zostały na rysunku 13. Paradoksalnie wraz z czasem rozpylania maleje stężenie cząstek



Rys. 13. Zmiany stężenia cząstek podczas opadania aerozolu BCs

w komorze. Efekt ten jest związany z przekroczeniem stężenia, które może być zdetekowane przez przyrząd.

Na rysunku 14 przedstawione zostały zmiany stężenia cząstek podczas opadania aerozolu. Wraz z upływem czasu wzrasta ilość detekowanych cząstek. Przyczyną tego efektu jest mechanizm opisany powyżej.



Rys. 14. Kinetyka opadania aerozolu BCs

4. Wnioski

Optyczne mierniki cząstek umożliwiają monitorowanie jakości powietrza w czasie rzeczywistym. Poprzednie modele z serii APS umożliwiały pomiar średnicy aerodynamicznej cząsteczek oraz wielkości rozproszenia światła. Pomiar tych parametrów nie pozwalał jednak na odróżnianie żywych drobnoustrojów od innych cząsteczek organicznych i nieorganicznych o zbliżonych rozmiarach. Unikalną cechą fluorescencyjnego miernika cząstek jest wzbudzenie i detekcja fluorescencji w zakresie charakterystycznym dla aktywnych cząstek biologicznych. Dane wyjściowe prezentowane są w postaci stabelaryzowanej i wykresów.

Pomiary wykazały ograniczenia przyrządu narzucające warunki wytwarzania aerozolu:

1. Standardowe stężenia stosowane w badaniach metodami mikrobiologicznymi są powyżej zakresu pomiarowego UVAPS. Objawem tego jest wysycenie charakterystyk kinetyki rozpylania i sedymentacji cząstek. Maksymalne mierzalne stężenie aerozolu wynosi 1000 #/cm^3 .
2. Pomiar fluorescencji aerozolu wymaga stężenia aerozolu niższego o jeszcze dwa rzędy wielkości. Maksymalne stężenie aerozolu do pomiaru fluorescencji wynosi 60 #/cm^3 .
3. Dwa powyższe warunki narzucają stosowanie do pomiarów aerozolu, który jest suchy. W przeciwnym wypadku cząsteczki wody w aerozolu maskują sygnał analizowanych próbek (drobnoustrojów). Suchy aerozol umożliwia jednoczesne badanie materiałów za pomocą UVAPS i metod mikrobiologicznych.

Praca wykonana została w ramach projektu badawczego zamawianego MNiSW-DBO-03-/I/2007.

Artykuł wpłynął do redakcji 19.11.2009 r. Zweryfikowaną wersję po recenzji otrzymano w styczniu 2010 r.

LITERATURA

- [1] A. D. WARTH, D. F. OHYE, W. G. MURRELL, *The composition and structure of bacterial spores*, J. Cell Biol., 16, 1963.
- [2] P. P. HAIRSTON, J. HO, F. R. QUANT, *Design of an instrument for real-time detection of bioaerosols using simultaneous measurement of particle aerodynamic size and intrinsic fluorescence*, J. Aerosol Sci., 3, 28, 1997.
- [3] M. WOS, P. POLLARD, *Sensitive and meaningful measures of bacterial metabolic activity using NADH fluorescence*, Water Res., 10, 40, 2006.
- [4] *Model 3314, TSI. Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer Sensor. User's Manual. P/N 1933797, Revision F, March 2007.*
- [5] V. AGRANOVSKI, Z. RISTOVSKI, M. HARGREAVES, P. J. BLACKALL, L. MORAWSKA, *Performance evaluation of the UVAPS: influence of physiological age of airborne bacteria and bacterial stress*, Aeros. Sci., 34, 2003, 301-317.

M. KALISZEWSKI, M. WŁODARSKI, R. LEWANDOWSKI,
M. KWAŚNY, K. KOPCZYŃSKI, E. A. TRAFNY, M. SZPAKOWSKA,
M. MULARCZYK-OLIWA

Determination of parameters of bacterial aerosol for measurement with UVAPS device

Abstract. The paper presents preliminary results of Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer's (UVAPS 3314, TSI) testing. The aim of work was testing the device that is probably unique in Poland, determination of concentration of microorganisms in aerosol optimal for measurements, and methodology of aerosol generation. Experiments showed that aerosol generated in closed chamber from water suspension or NaCl shows too low concentration of bacterial particles comparing to total amount of particles. As a result, it is not possible to record fluorescence signal of bacteria with UVAPS 3314 device. Performed experiments allowed for preliminary assessment of measurement capabilities of UVAPS.

Keywords: bacteria fluorescence spectra, biological aerosols, autofluorescence

Universal Decimal Classification: 579.6

