CIOP PIB

OZNACZANIE SZKODLIWYCH CZYNNIKÓW MIKROBIOLOGICZNYCH NA STANOWISKACH PRACY W ZAKŁADACH PRODUKUJĄCYCH I PRZETWARZAJĄCYCH BIOSUROWCE DO CELÓW ENERGETYCZNYCH

ZALECENIA

Anna Ławniczek-Wałczyk

Rafał L. Górny

Małgorzata Gołofit-Szymczak

Marcin Cyprowski

Agata Stobnicka

Anna Ławniczek-Wałczyk
Rafał L. Górny
Małgorzata Gołofit-Szymczak
Marcin Cyprowski
Agata Stobnicka

OZNACZANIE SZKODLIWYCH CZYNNIKÓW MIKROBIOLOGICZNYCH NA STANOWISKACH PRACY W ZAKŁADACH PRODUKUJĄCYCH I PRZETWARZAJĄCYCH BIOSUROWCE DO CELÓW ENERGETYCZNYCH

Zalecenia

CIOP PIB

Warszawa 2016

Opracowano i wydano w ramach III etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy" (2014-2016) finansowanego w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Narodowego Centrum Badań i Rozwoju oraz zadań służb państwowych przez Ministerstwo Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej.
Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

Autorzy
dr Anna Ławniczek-Wałczyk, prof. dr hab. n. med. Rafał L. Górny,
dr Małgorzata Gołofit-Szymczak, dr Marcin Cyprowski, dr inż. Agata Stobnicka
– Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

Opracowanie redakcyjne
Zespół Redakcji Wydawnictw Naukowych

Opracowanie graficzne
Anna Borkowska

Projekt okładki
Anna Antoniszewska

© Copyright by Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy
Warszawa 2016

CIOP PIB

Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czerniakowska 16, 00-701 Warszawa
tel. (22) 623 36 98, fax (22) 623 36 93, 623 36 95, www.ciop.pl

Spis treści

Wstęp 5

Zalecane metody i techniki pomiaru szkodliwych czynników mikrobiologicznych 7

Badanie bioaerozolu 9

Badanie biosurowców 14

Badanie czystości powierzchni 16

Badanie czystości higienicznej rąk pracownika 18

Analiza laboratoryjna próbek metodą hodowlaną 19

Genotypowanie szczepów bakteryjnych i grzybowych 22

Interpretacja wyników pomiarów 24

Piśmiennictwo 28

Załącznik 1.
Instrukcje pomiarowe 31

Pomiar bioaerozolu techniką filtracyjną za pomocą głowicy button sampler/cis 31

Pomiar bioaerozolu techniką impakcyjną za pomocą impaktora MAS 31

Pomiar bioaerozolu techniką impakcyjną za pomocą 6-stopniowego impaktora kaskadowego 32

Pobieranie próbek biomasy 33

Pobieranie wymazów z powierzchni użytkowych metodą szablonową 33

Pobieranie wymazów z powierzchni nieograniczonej szablonem, z trudno dostępnych miejsc i drobnego sprzętu 34

Pobieranie wymazów z rąk pracowników 34

Pobieranie zużytych półmasek ochronnych 35

Załącznik 2.
Analiza laboratoryjna próbek 36

Analiza laboratoryjna filtrów 36

Analiza laboratoryjna płytek z impaktora mas i kaskadowego 37

Analiza laboratoryjna próbek biomasy 37

Analiza laboratoryjna wymazów z powierzchni ograniczonej szablonem 38

Analiza laboratoryjna wymazów z dłoni,
powierzchni nieograniczonej szablonem,
z trudno dostępnych miejsc i drobnego sprzętu 39

Analiza laboratoryjna próbek półmasek ochronnych 39

Załącznik 3.
Metoda genotypowania szczepów
***Aspergillus fumigatus* wyizolowanych ze środowiska pracy** 41

Wstęp

Niezbędnym elementem kontroli rozprzestrzeniania się szkodliwych czynników biologicznych w środowisku pracy jest prowadzenie programów mających na celu szczegółowe poznanie ich dróg rozprzestrzeniania się oraz identyfikację źródła zanieczyszczenia (ich rezerwuarów). Jednakże wykonywanie oznaczeń mikrobiologicznych na stanowiskach pracy związanych z narażeniem na pył organiczny pochodzenia roślinnego i zwierzęcego wciąż nastręcza licznych trudności diagnostycznych i logistycznych w wielu polskich laboratoriach mikrobiologicznych. Wynikają one przede wszystkim z nieodpowiedniego wyboru stanowisk pomiarowych, rodzaju próbek, a także metody pomiaru i analizy (rys. 1). Niestety kolejne problemy pojawiają się po zakończeniu fazy laboratoryjnej. Sposób interpretacji uzyskanych wyników stężeń bioaerozoli również często budzi kontrowersje. Jest to spowodowane przede wszystkim brakiem powszechnie akceptowanych wartości dopuszczalnych stężeń mikroorganizmów w powietrzu oraz w innych próbkach (wymazy z powierzchni, surowce).

To opracowanie zawiera zestawienie stosowanych procedur/działań laboratoryjnych obejmujących kolejne fazy badań mikrobiologicznych na stanowiskach pracy, na których pracownicy są narażeni na kontakt ze szkodliwymi czynnikami biologicznymi związanymi z produkcją i przetwarzaniem surowców biodegradowalnych (biomasy).

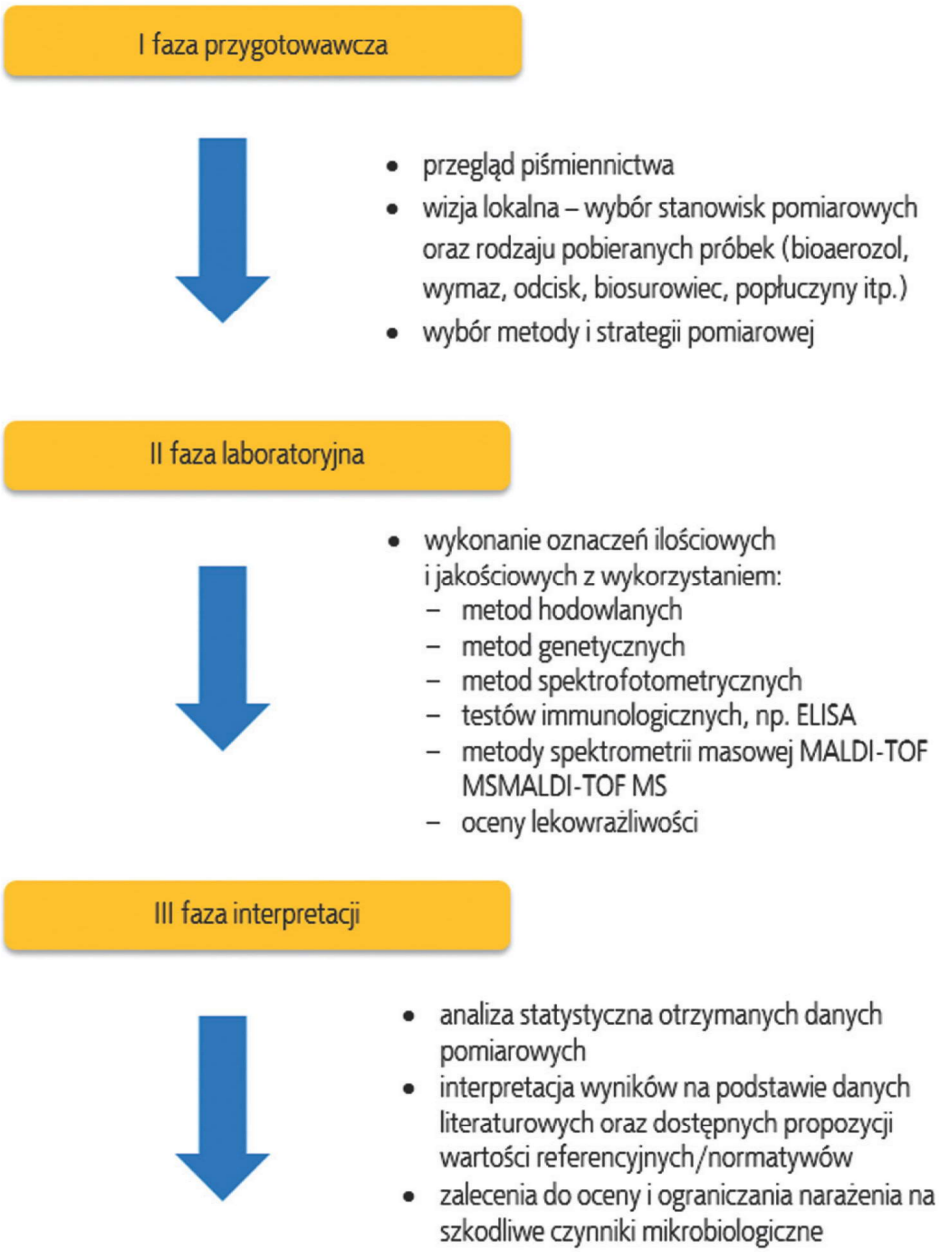
JAKIE RODZAJE BIOMASY SĄ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANE W POLSCE?

Do najczęściej wykorzystywanych w Polsce rodzajów biomasy stosowanych do produkcji ciepła i energii należą: produkty i odpady z produkcji rolnej i leśnej, odpady z produkcji spożywczej oraz przemysłu drzewnego, biodegradowalna frakcja surowców odpadów komunalnych.

Przeprowadzone w ostatnich latach badania wykazały, że charakter pracy przy przetwarzaniu biomasy do celów energetycznych wiąże się z długotrwałym przebywaniem pracowników w silnie zanieczyszczonym mikrobiologicznie środowisku. Na stanowiskach pracy w elektrociepłowniach średnie stężenia aerozolu bakteryjnego i grzybowego kształtowały się na poziomie 10^4 – 10^5 jtk/m^3. Należy podkreślić, iż zdecydowana większość tego rodzaju biosurowców przed procesami spalania czy też gazyfikacji musi być poddana obróbce wstępnej, np. suszeniu, rozdrobnieniu, przesiewaniu, zestaleniu itp. Czynności te mogą zwiększać narażenie pracowników na szkodliwe czynniki biologiczne na skutek przedostawania się do powietrza drobnoustrojów oraz ich fragmentów/toksyn podczas przetwarzania biomasy. Na wzrost stężenia mikroorganizmów w biosurowcach ma również wpływ sposób ich przechowywania, jak np. brak zadaszenia, niedostateczna wentylacja lub jej brak w halach i silosach, co może prowadzić do zwiększenia wilgotności niezbędnej do namnażania się bakterii i grzybów (Madsen, 2006; Sebastian i wsp., 2006; Madsen i wsp., 2009; Gołofit-Szymczak i Ławniczek-Wałczyk, 2011; Ławniczek-Wałczyk i wsp., 2012).

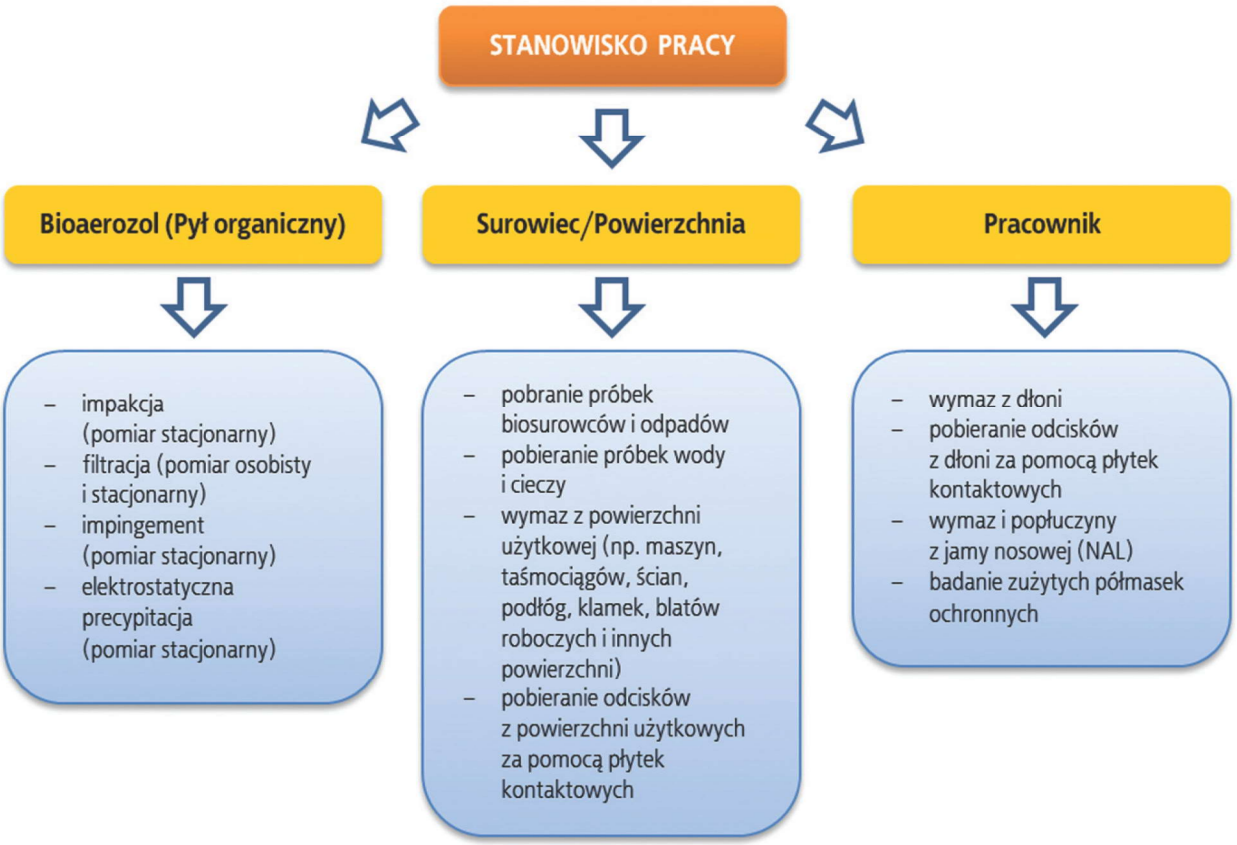
Zalecane metody i techniki pomiaru szkodliwych czynników mikrobiologicznych

Specyfika wykonywanych czynności zawodowych, jak również rodzaj szkodliwych czynników biologicznych występujących w badanym środowisku pracy warunkują wybór stanowisk pomiarowych oraz metod pomiaru (rys. 2).



Rys. 1. Fazy badań mikrobiologicznych na stanowiskach pracy

Wizja lokalna w zakładzie pracy oraz/lub analiza informacji odnośnie do warunków pracy dostarczonych przez specjalistę ds. BHP danego zakładu pracy umożliwi również dobranie metody i strategii pomiarowej adekwatnych do charakteru zagrożeń biologicznych występujących na stanowiskach pracy. Należy zaznaczyć, iż dobór metody zależy od rodzaju badanych próbek oraz od zakładanych dalszych faz analitycznego opracowywania pobranego materiału. Niezależnie od wybranej metody pomiarowej w ciągu 24 godzin od momentu pobrania próbek należy je przetransportować do laboratorium, aby wykonać analizę mikrobiologiczną.



Rys. 2. Rodzaje pobieranych próbek na stanowiskach pracy oraz metod pomiarowych

Badanie bioaerozolu

Największe zagrożenie na stanowiskach pracy stwarzają szkodliwe czynniki biologiczne w postaci bioaerozoli. Zawieszone w powietrzu bakterie i grzyby, a także ich fragmenty i metabolity, należy pobierać **metodami wolumetrycznymi**, polegającymi na pobraniu próbki powietrza o określonej objętości. Najczęściej wykorzystywane są następujące techniki pobierania próbek bioaerozoli:

- **impakcja** – separacja i wychwyt cząstek biologicznych ze strumienia powietrza na stałe podłoże (np. na płytkę z podłożem mikrobiologicznym) następuje na skutek inercji; przykładowe mierniki: 6-stopniowy impaktor Andersena, Mas 100 NT
- **impingement** – rodzaj impakcji, w której powierzchnię wychwytu stanowi ciecz (np. jałowa woda, sól fizjologiczna, olej mineralny); przykładowe mierniki (impingery): AGI-4, AGI-30 oraz BioSampler
- **filtracja** – separacja cząstek w czasie przepływu strugi powietrza przez porowate medium w postaci filtru; przykładowe mierniki: Button Sampler, CIS i GSP.

Przykładowe instrukcje pomiarów techniką impakcyjną i filtracyjną zamieszczono w załączniku 1.

UWAGA! Nie stosować metody sedymentacyjnej.

Pomiar polega na pozostawieniu przez 15-30 min otwartych płytek z podłożami na stanowisku pomiarowym. Metoda ta jest niedokładna, nie umożliwia wiarygodnego określenia stężenia mikroorganizmów w 1 m^3 powietrza. Za jej pomocą nie można wykryć większości bakteryjnych patogenów (komórek o niewielkich rozmiarach), których szybkość opadania na podłoże jest bardzo mała w stosunku do szybkości np. grzybów pleśniowych.

Po wykonaniu pomiaru techniką impakcyjną płytki z podłożem mikrobiologicznym inkubuje się przez odpowiedni okres (zwykle ok. 7 dni), a po zliczeniu kolonii oraz uwzględnieniu objętości próbki wyznacza się stężenie mikroorganizmów w jednostkach tworzących kolonie (jtk) w 1 m^3 powietrza [jtk/m^3]. Należy zaznaczyć, że liczbę kolonii mikroorganizmów wyrosłych na podłożu każdorazowo weryfikuje się z wykorzystaniem tablicy konwersyjnej opracowanej przez producenta użytego impaktora. W przypadku impkacji do cieczy, po pomiarze część uzyskanej zawiesiny wysiewa się na płytki Petriego z odpowiednimi podłożami. Po okresie inkubacji wyznacza się liczbę jednostek tworzących kolonie w 1 m^3 powietrza. Po pomiarze z użyciem głowic filtracyjnych filtry pomiarowe są poddawane ekstrakcji w odpowiednim roztworze (np. soli fizjologicznej z dodatkiem 0,05% Tweenu 80). W celu zliczenia żywych mikroorganizmów otrzymaną zawiesinę wysiewa się na płytki Petriego z odpowiednimi podłożami, a stężenie mikroorganizmów oblicza się w jednostkach tworzących kolonie (jtk) na 1 m^3 powietrza.

CZY SĄ NORMY DOTYCZĄCE POBIERANIA PRÓBEK MIKROBIOLOGICZNYCH?

W Polsce warunki pobierania mikrobiologicznych próbek powietrza określają normy: PN-EN 13098, PN-EN 14031, PN-EN 14042 i PN-EN 14583.

W normie PN-EN 13098 podano zalecenia dotyczące pobierania próbek metodami wolumetrycznymi (wykorzystującymi impakcję lub filtrację), dopuszczając możliwość oceny stopnia mikrobiologicznego skażenia powietrza przez oznaczenie składników komórek mikroorganizmów (endotoksyn, glukanów) oraz pierwotnych (ATP) i wtórnych (mikotoksyny) metabolitów. Norma PN-EN 14031 zawiera wytyczne do oceny narażenia na endotoksyny zawieszone w powietrzu na stanowiskach pracy. Przedstawiono w niej szczegółowo warunki pobierania, transportu, przechowywania i oznaczania endotoksyn. Do oznaczania endotoksyn zaleca się stosowanie kinetycznej chromogennej modyfikacji testu LAL. Z kolei w normie PN-EN 14042 omówiono strategię wyboru celu pomiaru czynników chemicznych i biologicznych. Podano zasady doboru procedur pomiarowych i mierników, omówiono charakterystykę działania aspiratorów oraz podano opis metod pobierania i praktyczne zasady ich stosowania w pomiarach indywidulanych i stacjonarnych. W tej normie opisano również metody pomiaru zawieszonych w powietrzu mikro-

organizmów i endotoksyn z zastosowaniem impaktorów, impingerów i poborników z filtrem. W normie PN-EN 14583 zostały szczegółowo opisane wymagania oraz metody testowania pomocne przy wyznaczaniu sprawności mierników wolumetrycznych używanych do pomiarów bioaerozoli na stanowiskach pracy.

Bioaerozol – strategie pomiarowe i liczba próbek

Do pomiaru bioaerozoli można zastosować dwie strategie pomiarowe: stacjonarną i osobistą. W przypadku pomiaru stacjonarnego miernik (impaktor, impinger) ustawia się na stanowisku pomiarowym na wysokości 1,0 – 1,5 m nad powierzchnią podłogi/gruntu, aby pobierać bioaerozol ze strefy oddechowej człowieka (położenie jamy ustnej i nosowej), (rys. 3). Natomiast lekkie mierniki do pomiaru osobistego (np. button sampler czy głowica GSP i CIS) są mocowane na specjalnych szelkach/paskach, zakładanych pracownikowi tak, aby głowica z filtrem (jako powierzchnią wychwytu cząstek biologicznych) znajdowała się na wysokości jego strefy oddechowej (rys. 4). Tego rodzaju strategia pomiarowa będzie pomocna przy określeniu narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne pracownika, którego praca jest związana z obsługą/dozorem kilku instalacji technologicznych.

Przykładową instrukcję pobierania próbek bioaerozoli zamieszczono w załączniku 1.

Trzeba podkreślić, że celem każdego pomiaru jest uzyskanie próbek, które są reprezentatywne dla danego stanowiska pracy i rodzaju wykonywanych czynności. Pomiary zazwyczaj przeprowadza się w trakcie trwania czynności zawodowych. W niektórych przypadkach jest wskazane wykonanie również pomiarów przed zakończeniem pracy i po jej zakończeniu przez pracownika na stanowisku pracy.

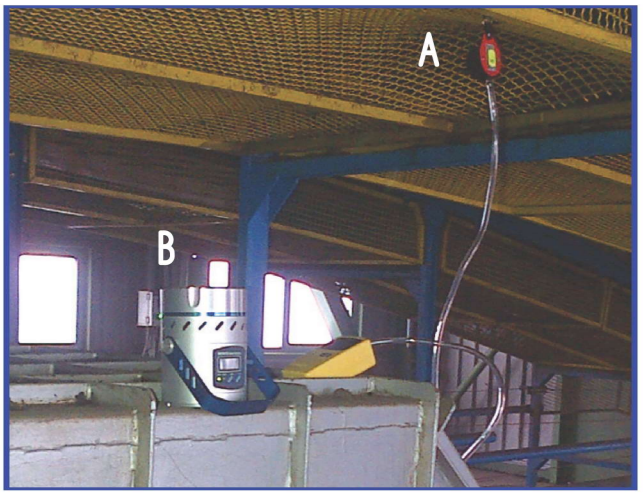
ILE POBIERAĆ PRÓBEK BIOAEROZOLU?

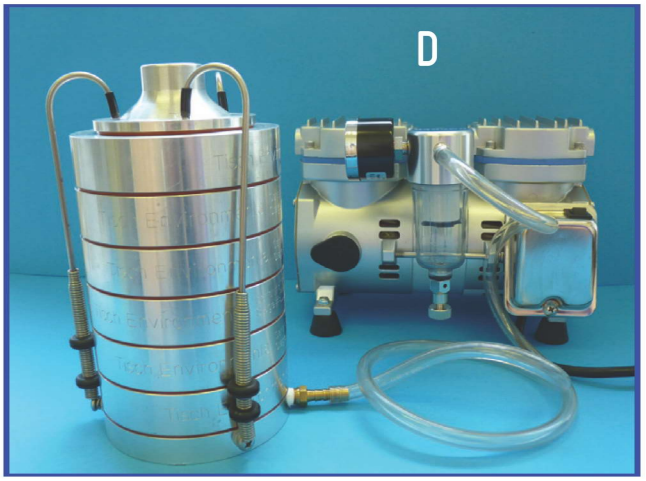
Pomiary bioaerozolu z użyciem głowic filtracyjnych filtrów, impaktorów lub impingerów powinny być wykonywane w dwóch powtórzeniach na każdym stanowisku pomiarowym.

LICZBA STANOWISK POMIAROWYCH

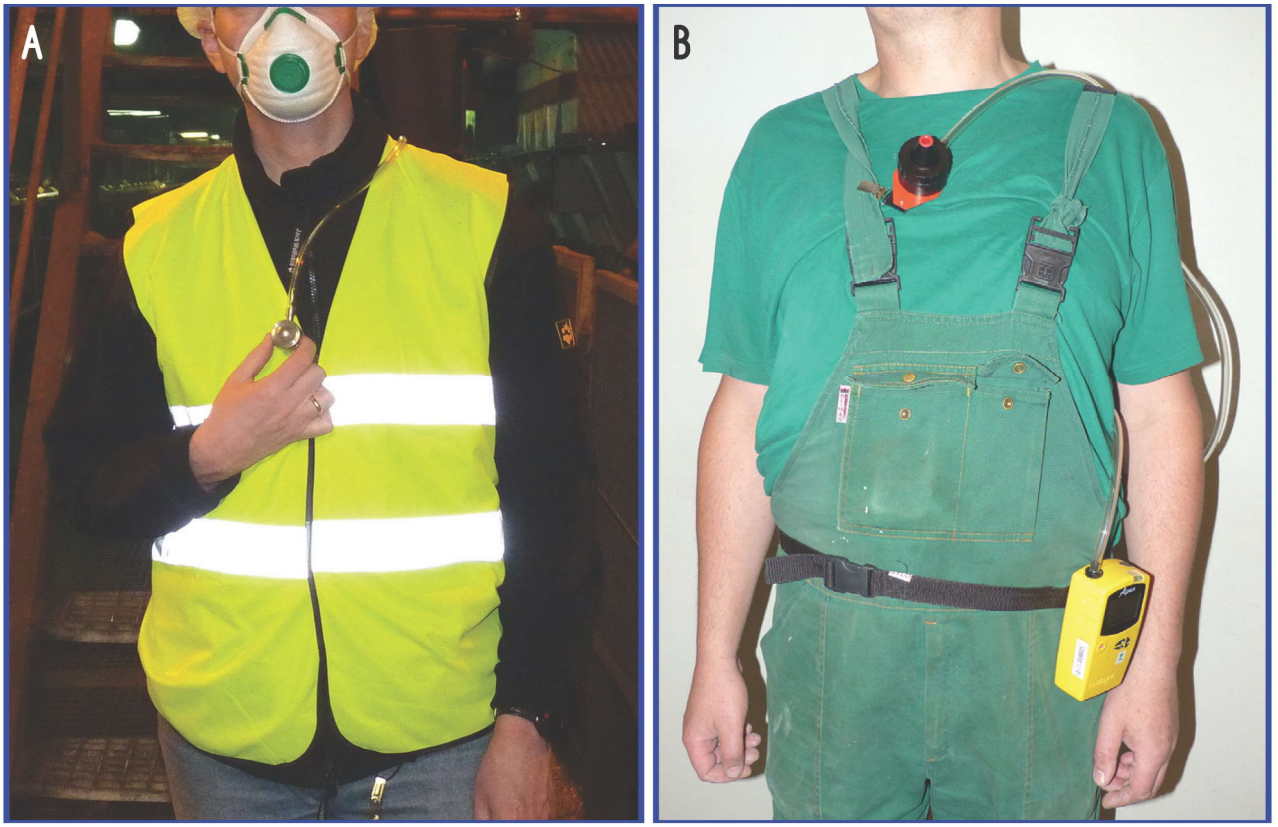
Liczba stanowisk pomiarowych powinna być adekwatna do liczby stanowisk pracy związanych z narażeniem na szkodliwe czynniki mikrobiologiczne. Przed zaplanowaniem pomiarów warto przyjrzeć się układowi badanych hal/pomieszczeń i wyznaczyć stanowiska pomiarowe znajdujące się w miejscach najbardziej narażonych na kontakt ze szkodliwym czynnikiem biologicznym na danym stanowisku pracy (np. przy maszynach, taśmociągach).

UWAGA! Planując liczbę stanowisk pomiarowych, należy uwzględnić oprócz stanowisk pracy wzdłuż linii technologicznej czy też pionu biurowego przynajmniej jedno stanowisko tzw. tła zewnętrznego. Punkt ten powinien być zlokalizowany w odległości ok. 50 m od zakładu pracy. Tego rodzaju pomiar dostarczy informacji o wpływie zanieczyszczeń z powietrza atmosferycznego na stężenia mikroorganizmów na stanowiskach pracy.





Rys. 3. Pomiar stacjonarny za pomocą: A – głowicy CIS (ang. *conical inhalable sampler*, Casella CEL, Bedford, Wielka Brytania) wraz z aspiratorem (Casella CEL), B – impaktora MAS 100Eco; C – impaktor MAS 100NT (Merck Eurolab, Szwajcaria); D – 6-stopniowego impaktora kaskadowego wraz z pompą (Tisch Environmental, South Miami, OH, USA), (fot. CIOP-PIB)



Rys. 4. Pomiar osobisty za pomocą: A – głowicy button sampler (SKC Ltd., Eighty Four, PA, USA), B – głowicy CIS (Casella CEL) wraz z aspiratorem (Casella CEL), (fot. CIOP-PIB)

Badanie biosurowców

Badanie biosurowców pod kątem zawartości szkodliwych czynników mikrobiologicznych odgrywa znaczącą rolę w monitoringu zanieczyszczenia mikrobiologicznego na stanowiskach pracy. Należy zaznaczyć, że badane próbki biosurowców muszą być reprezentatywne dla badanego materiału lub jego dostawy/partii. Stąd też bardzo ważne jest zaplanowanie liczby próbek. W przypadku biomasy można pobrać kilka próbek pierwotnych o mniejszej objętości (np. 0,5 kg), które następnie są łączone w większą próbkę (minimum 3 kg). Trzeba podkreślić, że różne rodzaje biosurowców mogą mieć różną fakturę i kształt, co może uniemożliwić pobór do standardowych sterylnych pojemników czy woreczków (rys. 5).

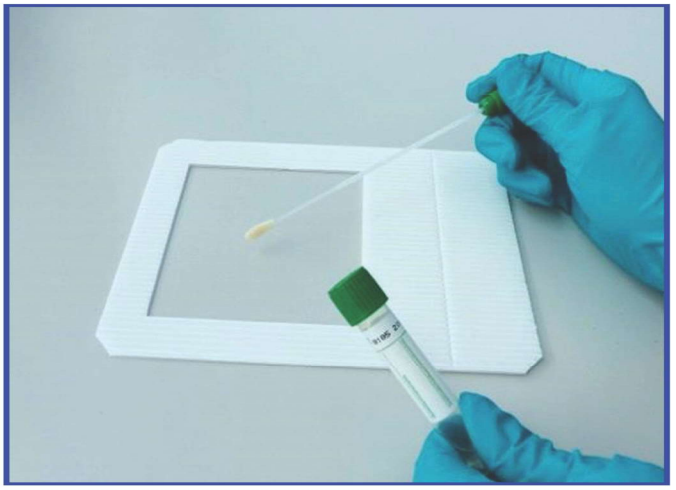
Stanowiska poboru próbek powinny być równomiernie rozmieszczone w całym obszarze próbkowania (np. w magazynie, hali). Liczba próbek pierwotnych musi być wystarczająco duża, aby umożliwić uzyskanie reprezentatywnej średniej (minimum 3). Po ekstrakcji biosurowców w buforze płuczącym z uzyskanej zawiesiny wykonuje się wiele rozcieńczeń, a następnie wysiewa inokulum na płytki Petriego z odpowiednimi podłożami mikrobiologicznymi. **Stężenie mikroorganizmów bateryjnych i grzybowych oblicza się w jednostkach tworzących kolonie (jtk) na 1 gram surowca [jtk/g]**. W niektórych przypadkach **stężenie mikroorganizmów** można również obliczać w jtk na 1 litr surowca [jtk/l].

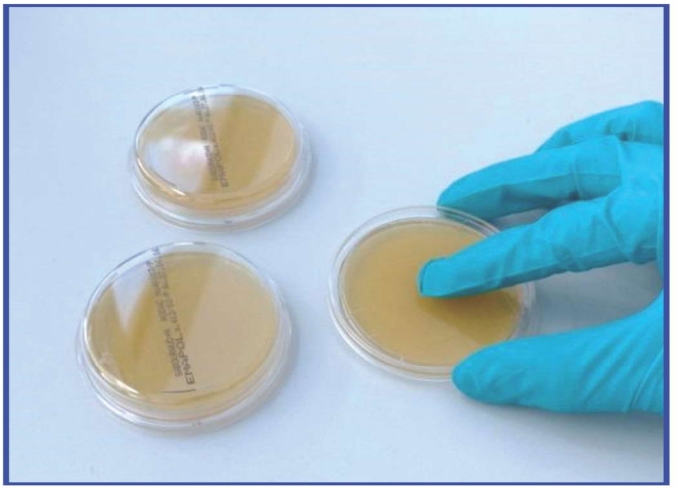
Przykładową instrukcję pobierania próbek biosurowców zamieszczono w załączniku 1.

Rys. 5. Rodzaje badanych biosurowców: A – brykiet ze słomy, B – pelet ze słomy, C – zrębka leśna gruba, D – pelet z łupin słonecznika, E – brykiet z kukurydzy, F – rozdrobniona pestka owocu olejowca gwinejskiego (PKS, ang. *palm kernel shell*), G – zrębka leśna drobna, H – biodegradowalna frakcja odpadów komunalnych (fot. CIOP-PIB)

Badanie czystości powierzchni

Badanie czystości powierzchni metodą szablonową służy do określenia czystości mikrobiologicznej powierzchni roboczych o dużej i stosunkowo jednorodnej powierzchni, np. blatów roboczych, ścian, podłóg i fragmentów maszyn. W tym celu do badanej powierzchni przykłada się sterylny szablon o powierzchni otworu wewnętrznego 100 cm^2, a następnie kilkukrotnie przeciera wymazówką (o nylonowej lub bawełnianej końcówce, zwilżonej odpowiednim płynem – sterylną wodą lub solą fizjologiczną) obszar ograniczony szablonem (rys. 6A). Wymazówkę wkłada się do probówki z płynem płuczącym. Z uzyskanej zawiesiny wykonuje się wiele rozcieńczeń, a następnie wysiewa inokulum na płytki Petriego z podłożami mikrobiologicznymi. Stężenie mikroorganizmów wyznacza się w jednostkach tworzących kolonie (jtk) na 1 cm^2 badanej powierzchni. W przypadku powierzchni trudno dostępnych (np. z anemostatów), o porowatych i nieregularnych kształtach, stosuje się metodę wymazu z powierzchni bez ograniczania szablonem. Stężenie mikroorganizmów wyznacza się w jednostkach tworzących kolonie (jtk) na całą badaną powierzchnię.





Rys. 6. Pomiar czystości mikrobiologicznej powierzchni metodą wymazu z użyciem szablonu (A) oraz z użyciem płytek kontaktowych (B), (fot. CIOP-PIB)

W badaniach czystości powierzchni stosuje się także metodę płytek kontaktowych (rys. 6B), która najlepiej się sprawdza w wypadku powierzchni suchych i gładkich (np. podłoga, ściana, blat, odzież). Do badanej powierzchni przykłada

się specjalne płytki kontaktowe typu RODAC zawierające podłoże agarowe o wypukłym menisku (powierzchnia styku 25 cm^2). Pomiar wykonuje się przez przyciśnięcie wypukłej części płytki do badanej powierzchni na kilka sekund. Po okresie inkubacji zlicza się wyrosłe kolonie, a wynik wyraża się w jednostkach tworzących kolonie na 25 cm^2 (pole powierzchni płytki).

UWAGA! W celu zapewnienia powtarzalności wyników podczas długookresowego monitoringu zanieczyszczenia wymazy/odciski muszą być pobierane z tych samych miejsc i w ten sam sposób.

Przykładową instrukcję pobierania wymazów z powierzchni zamieszczono w załączniku 1.

Badanie czystości higienicznej rąk pracownika

W wielu zakładach pracy, niezwiązanych z przemysłem spożywczym, farmaceutycznym czy opieką zdrowotną, coraz częściej bada się czystość mikrobiologiczną rąk pracownika.

W tym celu pobiera się wymazy z obu jego dłoni. Pomocne mogą być też płytki kontaktowe. Sposób pomiaru i analiza tego rodzaju próbek są takie, jak w przypadku oceny czystości powierzchni (patrz s. 16).

Do badania rozprzestrzeniania się szkodliwych czynników mikrobiologicznych pomocna może być także analiza zużytych półmasek ochronnych stosowanych w danym zakładzie pracy. Uzyskane w ten sposób informacje o stopniu zanieczyszczenia mikrobiologicznego powierzchni filtracyjnej w czasie zmiany roboczej oraz o rodzaju czynników biologicznych występujących na danym stanowisku pracy mogą istotnie wpłynąć na dobór środków prewencyjnych oraz stosowane procedury profilaktyczne (w tym na wznowienie szkolenia z zakresu higieny na stanowisku pracy i użytkowania półmasek ochronnych).

Przykładową instrukcję pobierania wymazów z rąk pracowników oraz zużytych półmasek ochronnych zamieszczono w załączniku 1.

Analiza laboratoryjna próbek metodą hodowlaną

W zależności od rodzaju pobranych próbek stosowane są różne metody ich analizy.

Przykładowe procedury analizy laboratoryjnej próbek pobranych w środowisku pracy związanych z przetwarzaniem biomasy do celów energetycznych przedstawiono w załączniku 2.

Identyfikacja mikroorganizmów bakteryjnych

Analiza jakościowa mikroorganizmów bakteryjnych wyizolowanych z próbek środowiskowych (powietrza, biomasy, półmasek ochronnych oraz wymazów z rąk) powinna być przeprowadzona w trzech kolejnych etapach, polegających na obserwacjach makro- i mikroskopowych oraz charakterystyce biochemicznej wyizolowanych szczepów. Wszystkie wyizolowane kolonie bakterii należy przesiać na odpowiednie podłoża mikrobiologiczne, a następnie inkubować w cieplarkach przez 24 godziny w temperaturze 37 °C . W celu uzyskania czystej hodowli wyodrębnionych kolonii posiewy należy wykonywać metodą redukcyjną. **Wytypowane szczepy mikroorganizmów można poddać głębokiemu zamrożeniu w specjalnych probówkach w temperaturze -80 °C w celu ich późniejszej analizy genetycznej.**

Analiza makroskopowa

Analiza makroskopowa polega na określeniu takich cech morfologicznych kolonii, jak: wielkość, kształt, brzeg kolonii, barwa, profil, przejrzystość, konsystencja, odbarwienie podłoża oraz cech hodowlanych szczepów izolowanych na odpowiednich podłożach: TSA z krwią, EMB, Chapmana oraz 50% TSA.

Analiza mikroskopowa

Analiza mikroskopowa polega na obserwacji preparatów mikrobiologicznych barwionych metodą Grama. Preparaty wykonuje się z czystych 24-godzinnych

hodowli bakterii. Obserwacja mikroskopowa umożliwia uzyskanie informacji na temat: kształtu i wielkości komórek, ich układu względem siebie oraz występowania przetrwalników. Dodatkowo wynik barwienia metodą Grama potwierdzano testem z 3-procentowym roztworem KOH. Wybarwione mikroorganizmy były obserwowane w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 1000×.

Analiza cech biochemicznych

Analiza cech biochemicznych bakterii polega na określeniu ich zdolności do asymilacji, fermentacji lub rozkładu określonych związków organicznych. W celu identyfikacji wyizolowanych kolonii bakterii można się posłużyć np. mikrotestami API – ID 32 STAPH, API 20 STREP, API CORYNE, API 50 CHB, API 20 E, API 20 NE (bioMérieux SA, Marcyl' Etoile, Francja) oraz systemem OMNILOG COMBO PLUS ID (BIOLOG, Inc., Hayward, USA).

Identyfikacja mikroorganizmów grzybowych

Analizę jakościową mikroorganizmów grzybowych należy przeprowadzić, opierając się na dostępnych w literaturze kluczach do oznaczania grzybów strzępkowych oraz drożdżopodobnych podanych przez: Barnett i Payne'a (1986), Domscha i wsp. (1995), Klich (2002), Pitta (2000), Samsona i Frisvada (2000), Samsona i wsp. (2004) oraz Krzyściaka i wsp. (2011). Grzyby wyizolowane z próbek powietrza identyfikowano do szczebla rodzaju lub gatunku. **Wytypowane szczepy mikroorganizmów można poddać głębokiemu zamrożeniu w specjalnych probówkach w temperaturze -80 °C w celu ich późniejszej analizy genetycznej.**

Analiza makroskopowa grzybów strzępkowych i drożdżopodobnych

Analiza makroskopowa grzybów strzępkowych polega na określeniu cech morfologicznych kolonii. Wyizolowane kolonie grzybów należy przesiać na podłoże MEA/CA i hodować w cieplarkach przez 7 – 14 dni w temperaturze 25 °C. Po wstępnej ocenie morfologii kolonii pod stereomikroskopem oraz analizie mikroskopowej preparatów grzybni barwionych laktofenolem badane szczepy grzybów powinno się przesiać na następujące podłoża: MEA, CA (podłoże Czapka-Doxa), CYA (CA z dodatkiem ekstraktu drożdżowego) oraz PDA (agar glukozowo-ziemniaczany), a następnie inkubować przez 7 – 14 dni w temperaturze 25 °C. Kolonie

grzybów z rodzaju *Aspergillus* należy identyfikować na płytkach z podłożem CYA, MEA i CA inkubowanych przez 7 dni w temperaturze 25 °C oraz na podłożu CYA w temperaturze 37 °C. W celu precyzyjnej identyfikacji grzybów z rodzaju *Penicillium* wyizolowane szczepy hoduje się przez 7 dni na podłożu CYA w temperaturze 25 °C, 30 °C i 37 °C oraz na MEA, YES (podłoże z ekstraktem drożdżowym i sacharozą) i CREA (podłoże z kreatyną i purpurą bromokrezolową) w temperaturze 25 °C. Po wymaganym okresie inkubacji analizuje się następujące cechy kolonii: tempo wzrostu, wielkość, wyniesienie nad powierzchnię podłoża, wygląd powierzchni i brzegu kolonii, kolor jej awersu i rewersu, konsystencję, zapach, ewentualną dyfuzję pigmentu do podłoża oraz wydzielanie kropel substancji. Morfologię grzybów drożdżopodobnych ocenia się na podłożu MEA oraz Sabouraud z dodatkiem chloramfenikolu. Płytki inkubuje się przez 48 – 72 godzin w temperaturze 25 – 30 °C, a następnie analizuje tempo wzrostu kolonii, jej wielkość, konsystencję i kolor.

Analiza mikroskopowa grzybów strzępkowych i drożdżopodobnych

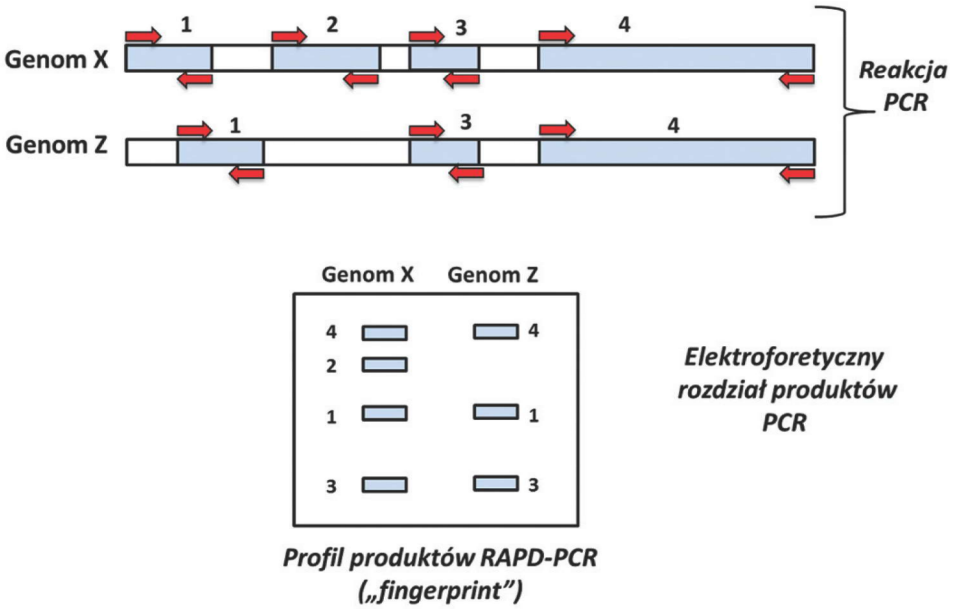
Analiza mikroskopowa grzybów strzępkowych polega na ocenie w preparatach kolonii barwionych laktofenolem następujących cech grzybni: kształtu, sposobu rozgałęzienia, występowania przegród lub ich braku, obecności struktur rozmnażania bezpłciowego (wielkość i kształt konidioforów, liczba metuli, ułożenie fialid; sporangioforów; kształt, ułożenie i wielkość zarodników) i płciowego (askospor; klejstotecjów; piknidiów; sklerocjów). Ocena mikromorfologii grzybów drożdżopodobnych opiera się również na obserwacji preparatów kolonii barwionych laktofenolem. Dodatkowo określa się zdolność do tworzenia przez drożdże chlamydospor, strzępek lub pseudostrzępek metodą Dalmau na agarze kukurydzianym z Tweenem. W tym celu inokuluje się izolowane kolonie drożdży na podłoże CMA, a następnie przykrywa je jałowym szkiełkiem nakrywkowym. Po 48-godzinnym okresie inkubacji w temperaturze 25 °C hodowlę ocenia się pod mikroskopem świetlnym.

Analiza cech biochemicznych grzybów drożdżopodobnych

W celu identyfikacji cech biochemicznych grzybów drożdżopodobnych można posłużyć się testem API 20 C AUX (bioMérieux SA), który umożliwia określenie ich zdolności do enzymatycznego rozkładu poszczególnych związków organicznych. Uwzględnia się w nim wyniki testu na obecność strzępek lub pseudostrzępek na podłożu CMA. Testy API interpretuje się z wykorzystaniem internetowej bazy danych.

Genotypowanie szczepów bakteryjnych i grzybowych

Metody molekularne mają istotną przewagę nad metodami biochemicznymi, gdyż nie są uzależnione od warunków hodowli na podłożach mikrobiologicznych. Są one oparte na analizie materiału genetycznego danego mikroorganizmu, który jest unikatowy i stały w porównaniu z cechami fenotypowymi, mogącymi ulegać modyfikacji pod wpływem czynników środowiskowych. Nowoczesne techniki różnicowania mikroorganizmów znacznie ułatwiają monitorowanie transmisji patogenów w środowisku pracy. Niestety w porównaniu z metodami tradycyjnymi wymagają bardzo kosztownej aparatury i drogich odczynników. Do typowania genetycznego wykorzystuje się najczęściej metody typu „fingerprinting", czyli „genetycznego odcisku palca". Jedną z najprostszych i najpopularniejszych metod PCR wykorzystywanych do oceny pokrewieństwa genetycznego jest technika RAPD (technika losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA, ang. *random amplified polymorphic DNA*). Opiera się ona na zastosowaniu jednego lub dwóch primerów łączących się losowo z mniej lub bardziej homologicznymi sekwencjami łańcucha DNA. Amplifikacja w reakcji PCR powoduje powstanie określonego profilu genotypowego, umożliwiającego analizę i porównanie izolatów. Zmniejszoną specyficzność przyłączania primerów do matrycy DNA uzyskuje się przez obniżenie temperatury przyłączania w cyklach reakcji PCR. Amplifikację fragmentu DNA warunkuje odpowiednia orientacja i odległość primerów na obu



Rys. 7. Schemat przedstawiający metodę RAPD-PCR (Kumar i Gurusubramanian, 2011)

niciach (nieprzekraczająca 1500 – 2000 par zasad, pz), (rys. 7), (Kumar i Gurusubramanian, 2011).

W wyniku amplifikacji uzyskuje się od kilku do kilkudziesięciu amplikonów w zakresie ok. 100 – 2000 pz. Następnie utworzone fragmenty DNA rozdziela się elektroforetycznie, uzyskując charakterystyczny profil „fingerprint". Uzyskany profil elektroforetyczny produktów PCR odzwierciedla różnice w sekwencji nukleotydowej miejsc wiążących primer, różnice w długości amplifikowanych fragmentów i w konformacji DNA wpływającej na wydajne wiązanie starterów i amplifikację. Im mniejsze pokrewieństwo między badanymi szczepami, tym większe różnice w liczbie i długości amplikonów. Dzięki prostocie i szybkości wykonania technika RAPD-PCR jest szeroko stosowana w badaniach epidemiologicznych, zarówno mikroorganizmów bakteryjnych, jak i eukariotycznych (Morandi i wsp., 2010; Diab i wsp., 2011; Kumar i Gurusubramanian, 2011, Zeinali i wsp., 2015).

Izolacja genomowego DNA

Izolację DNA z próbek (popłuczyn z filtrów lub wymazów) oraz z żywych szczepów prowadzi się za pomocą komercyjnych zestawów do izolacji genomowego DNA, najczęściej z wykorzystaniem złoża krzemionkowego zamkniętego w membranie kolumienek. Zawartość i czystość DNA badanych szczepów należy sprawdzić za pomocą spektrofotometru UV/VIS do mikroobjętości. Wyizolowane i oczyszczone DNA można przechowywać w temperaturze –20 °C do czasu dalszych analiz.

Reakcja RAPD

W celu przeprowadzenia genotypowania szczepów grzybowych należy dokonać optymalizacji reakcji PCR. Optymalizowanymi parametrami są sekwencje starterów oraz ich kombinacje w reakcji PCR, a także temperatura przyłączania starterów w tej reakcji. W optymalizacji wykorzystuje się trzy – cztery sekwencje oligonukleotydowe primerów.

Przykładową analizę metodą RAPD-PCR szczepów *Aspergillus fumigatus* przedstawiono w załączniku 3.

Interpretacja wyników pomiarów

Ocena czystości mikrobiologicznej powietrza

Interpretacja wyników pomiarów bioaerozoli w środowisku wnętrz jest utrudniona ze względu na brak powszechnie uznanych wartości normatywnych lub referencyjnych. Oznaczanie stopnia mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza, wyrażonego liczbą jednostek tworzących kolonie (jtk) w 1 m^3 powietrza, jest jak dotąd najlepiej znaną i najczęściej stosowaną miarą określającą narażenie na szkodliwe czynniki biologiczne. Narażenie na czynniki biologiczne w środowisku pracy jest istotnym problem, podejmowane są więc liczne starania mające na celu wyznaczenie dla nich normatywów higienicznych.

Obecnie w Polsce zebrane dane pomiarowe interpretuje się na podstawie zalecenia wydanego w 2004 r. przez Zespół Ekspertów ds. Czynników Biologicznych Międzyresortowej Komisji ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy (ZECB). Zaproponowane wartości dopuszczalnych stężeń najpowszechniejszych grup mikroorganizmów w pomieszczeniach roboczych zanieczyszczonych pyłem organicznym oraz w pomieszczeniach mieszkalnych i użyteczności publicznej zaprezentowano w tabeli 1 (*Czynniki szkodliwe w środowisku pracy...*, 2014).

Proponowane wartości referencyjne są niezwykle pomocne zarówno przy ocenie narażenia na czynniki biologiczne w środowisku pracy, jak i w podejmowaniu odpowiednich działań profilaktycznych i prewencyjnych. W innych branżach przemysłu (np. spożywczej, kosmetycznej) zakłady przemysłowe do oceny czystości powietrza i powierzchni wyznaczają własne, wewnętrzne wartości dopuszczalnego stężenia mikroorganizmów, które stosują do monitoringu zanieczyszczenia w halach produkcyjnych. Wartości te są obliczane na podstawie m.in. korelacji wyników długookresowego monitoringu zanieczyszczenia powietrza i jakości produktów.

Tabela 1. Propozycje dopuszczalnych stężeń drobnoustrojów w powietrzu według ZECB (*Czynniki szkodliwe w środowisku pracy...*, 2014)

Czynnik mikrobiologiczny	Pomieszczenia robocze zanieczyszczone pyłem organicznym	Pomieszczenia mieszkalne i użyteczności publicznej
Bakterie mezofilne	100 000 jtk/m^3 *	5 000 jtk/m^3
Bakterie Gram-ujemne	20 000 jtk/m^3 *	200 jtk/m^3
Termofilne promieniowce	20 000 jtk/m^3 *	200 jtk/m^3
Grzyby	50 000 jtk/m^3 *	5 000 jtk/m^3
Endotoksyna bakteryjna	200 ng/m^3 (2 000 JE/m^3)*	5 ng/m^3 (50 JE/m^3)

* Dla frakcji respirabilnej proponowane wartości powinny być o połowę mniejsze.

W odniesieniu do powietrza zewnętrznego obowiązywały do niedawna dwie normy dotyczące stopnia zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego bakteriami (PN-89/Z-04111/02) i grzybami (PN-89/Z-04111/03). Zostały one jednak wycofane ze względu na to, że nie uwzględniają nowoczesnego, zgodnego z obecnym stanem wiedzy, podejścia do zagadnienia czystości mikrobiologicznej powietrza. Dopuszczały bowiem przeprowadzanie pomiarów metodą sedymentacyjną, która nie daje rzeczywistego obrazu stopnia zanieczyszczenia powietrza. Zatem, zaproponowanych w nich kryteriów oceny stopnia zanieczyszczenia należy postrzegać jedynie jako wartości orientacyjnych. Najnowsze propozycje oceny stopnia zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego (*Czynniki szkodliwe w środowisku pracy...*, 2014) zostały wypracowane w wyniku pomiarów środowiskowych z uwzględnieniem potencjalnej szkodliwości określonego składnika bioaerozolu, przy założeniu, że stężenie poszczególnych jego składników w powietrzu atmosferycznym nie powinno przekraczać wartości dopuszczalnych stężeń dla powietrza w pomieszczeniach mieszkalnych, gdzie człowiek spędza większość czasu w ciągu życia.

Ocena czystości mikrobiologicznej powierzchni i rąk

Obecnie nie ma też powszechnie ustalonych wartości normatywnych w odniesieniu do stopnia zanieczyszczenia powierzchni w środowisku pracy zanieczysz-

czonym pyłem organicznym. W piśmiennictwie przedmiotu można natomiast spotkać normatywy higieniczne określające stopnie czystości pomieszczeń tzw. czystych w działaniu, według *Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 3 grudnia 2002 r. w sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania* (Dz.U. 2002, nr 224, poz. 1882), oraz pomieszczeń w zakładach przetwórstwa spożywczego (np. PN-A-82055-19). W ocenie czystości mikrobiologicznej powierzchni i rąk można się posłużyć wartościami proponowanymi przez BC Centre for Disease Control, dotyczącymi pomiarów za pomocą gąbek, wymazówek i płytek odciskowych (BCCDC, 2010), (tab. 2).

Tabela 2. Propozycje dopuszczalnych stężeń drobnoustrojów na powierzchni użytkowej oraz rąk według BCCDC (2010)

Ocena higieniczna	Pomiar z użyciem gąbki lub wymazówki z powierzchni nieograniczonej szablonem	Pomiar z powierzchni ograniczonej szablonem lub za pomocą płytek odciskowych (25 cm^2)
Powierzchnia czysta	< 45 jtk	< 5 jtk/cm^2
Powierzchnia zanieczyszczona	140 – 260 jtk	5 – 10 jtk/cm^2
Powierzchnia skrajnie zanieczyszczona	> 260 jtk	> 10 jtk/cm^2
Zawartość patogenów z grupy *Enterobacteriacae*	0 jtk/m^3	0 jtk/cm^2

Należy zaznaczyć, iż te normatywy nakładają bardzo wysokie wymagania co do jakości mikrobiologicznej i w omawianym środowisku pracy (zakłady związane z produkcją i przetwarzaniem biomasy) mogą stanowić jedynie orientacyjny punkt odniesienia. W tym środowisku pracy utrzymanie higienicznej czystości powierzchni na wielu stanowiskach pracy jest często niemożliwe.

Ocena czystości mikrobiologicznej biomasy

Interpretacja wyników pomiarów stężenia mikroorganizmów w próbkach biomasy jest utrudniona ze względu na brak ustalonych wartości dopuszczalnych

w odniesieniu do stopnia zanieczyszczenia biosurowców wykorzystywanych do produkcji energii i ciepła. Ocenę zagrożenia zdrowia pracowników ze strony mikroorganizmów bakteryjnych i grzybowych zawartych w badanych próbkach biomasy można wykonać, opierając się na *Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki.* Taka ocena jakościowa (bazująca na wynikach z jakościowej analizy mikrobiologicznej umożliwi stwierdzenie, czy wśród izolowanych mikroorganizmów występowały tylko organizmy saprotroficzne (zaliczane do grupy 1. zagrożenia, niestanowiące zagrożenia dla pracownika), czy też mikroorganizmy należące do grupy 2. Mikroorganizmy z grupy 2. mogą wywoływać u ludzi choroby i mogą być niebezpieczne dla pracowników, ale zazwyczaj istnieją w stosunku do nich skuteczne metody profilaktyki lub leczenia.

Stwierdzenie zanieczyszczenia czynnikami biologicznymi powinno być podstawą do podjęcia odpowiednich (w ramach przepisów prawa) działań zapobiegawczych mających na celu ochronę zdrowia zatrudnionych pracowników przed szkodliwymi czynnikami biologicznymi. Jako pierwsze powinny być wprowadzone rozwiązania systemowe, a następnie techniczne i organizacyjne oraz środki ochrony indywidualnej (jednorazowy sprzęt filtrujący, odzież i obuwie ochronne, gogle/okulary ochronne itp.)

Piśmiennictwo

Czynniki szkodliwe w środowisku pracy. Wartości dopuszczalne 2014 (2014) Red. D. Augustyńska, M. Pośniak. Warszawa, CIOP-PIB.

Barnett J., Payne RW. (1986) *Yeast: characteristic and identification.* Cambridge, Cambridge University Press.

BCCDC(2010) *Environmental hygiene monitoring. A guide for environmental health officers.* Vancouver, BC Centre for Disease Control.

Diab A.M., Al-Turk I.M. (2011) *ERIC and RAPD PCR-based DNA fingerprinting techniques application for microbial source tracking (MST) at Al-Madinah Al-Munwwarah, KSA*. J. Taibah Univ. Sci., 5:31-38.

Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. (1995) *Compendium of soil fungi.* London, Academic Press.

Gołofit-Szymczak M., Ławniczek-Wałczyk A. (2011) *Biomasa jako źródło zagrożeń biologicznych.* Bezpieczeństwo Pracy – Nauka i Technika, 12:17-19.

Klich M.A. (2002) *Identification of common Aspergillus species*. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Krzyściak P., Skóra M., Macura A.B. (2011) *Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka*. Wrocław, MedPharm.

Kumar N.S., Gurusubramanian G. (2011) *Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications*. Sci. Vision, 2011; 11:116-124.

Ławniczek-Wałczyk A., Gołofit-Szymczak M., Cyprowski M., Górny R.L. (2012) *Exposure to harmful microbiological agents during the handling of biomass for power production purposes*. Med. Pr., 63(4):395-407.

Madsen A.M., Schlünssen V., Olsen T., Sigsgaard T., Avci A.H. (2009) *Airborne fungal and bacterial components in PM1 dust from biofuel plants.* Ann. Occup. Hyg., 2009, 53(7):749-757.

Madsen A.M .(2006) *Exposure to airborne microbial components in autumn and spring during work at Danish biofuel plants*. Ann. Occup. Hyg., 50:821-831.

Morandi S., Brasca M., Lodi R., Brusetti L., Andrighetto C., Lombardi A. (2010) *Biochemical profiles, restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for typing Staphylococcus aureus isolated from dairy products.* Res. Vet. Sci., 88:427-435.

Pitt J.I. (2000) *A laboratory guide to common Penicillium species.* North Ryde: Food Science Australia, NSW.

Samson R.A., Frisvad J.C. (2000) *Penicillium subgenus Penicillium: New taxonomic schemes, Mycotoxins and other extrolites.* Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. (2004) *Introduction to food – and airborne fungi.* 7th ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Sebastian A., Madsen A.M., Martensson L., Pomorska D., Larsson L. (2006) *Assessment of microbial exposure risks from handling of biofuel wood chips and straw – effect of outdoor storage.* Ann. Agric. Environ. Med.,13:139-145.

Zeinali T., Jamshidi A., Rad M., Bassami M. (2015) *A comparison analysis of Listeria monocytogenes isolates recovered from chicken carcasses and human by using RAPD PCR.* Int. J. Clin. Exp. Med., 5;8(6):10152-10157.

Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 3 grudnia 2002 r. w sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania. Dz.U. 2002, nr 224, poz. 1882.

Rozporządzeniu Ministra zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki. Dz.U. 2005, nr 81, poz. 716, ze zm.

PN-89/Z-04111/02 *Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.* [Norma wycofana]

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.* [Norma wycofana]