

Izvēlēto mikrobioloģisko izpētes metožu piemērošana un aprobācija

Testēšanas standu no dažādiem materiāliem un ar dažādiem būvkonstruktīvajiem risinājumiem mikrobioloģiskā piesārņojuma novērtēšanai tika izmantotas divas metodes:

- sedimentācijas plates metode – gaisa paraugu iegūšanai;
- „nomazgājuma” metode – virsmas paraugu iegūšanai.

Kā pamata barotne mikroskopisko sēņu kultivēšanai tika izmantota 2% iesala ekstrakta barotne - universāla barotne sēņu un raugu audzēšanai, kas tiek plaši ieteikta iekštelpu mikrobioloģiskā piesārņojuma izvērtēšanai.

1. Gaisa paraugu vākšana

Atvērtas Petri plates standos tika novietotas apmēram 1 m augstumā, 1 m attālumā no sienām un maksimāli tālu no kondicioniera, lai samazinātu tiešu tā ietekmi paraugu savākšanas gaitā. Ieteicamais minimālais atkārtojumu skaits – 6 gab. plates, lai samazinātu rezultātu izkliedi, kas ir raksturīga gaisa paraugiem.

Ekspozīcijas laika noteikšana. Atkarībā no pētāmā objekta gaisa piesārņojuma pakāpes, ir svarīgi pareizi izvēlēties piemērotu ekspozīcijas laiku – laiku cik ilgi Petri plates telpā stāv atvērtas. Metodes standarts ir 1 stunda, tomēr atkarībā no apstākļiem šis laiks var svārstīties, piem., no 15 min. līdz vairākām stundām. Lai noteiktu piemērotāko ekspozīcijas laiku, trīs standos - AER, EXP, LOG, kas atšķirās ar telpas gaisa mitrumu un kur bija sagaidāmi atšķirīgi rezultāti mikrobioloģiskajās analizēs, vienlaicīgi tika ņemti gaisa paraugi ar ekspozīcijas laiku 1 h un 2 h. Rezultāti, kas apkopoti 1. tabulā, parādīja, ka konkrētajos apstākļos ekspozīcijas laiks ir 1 h ir par īsu, lai uz platēm varētu savākt pietiekami daudz sēņu sporu, tāpēc turpmāk, vācot gaisa paraugus, izvēlētais ekspozīcijas laiks bija 2 h.

1.tabula. Ekspozīcijas laika ietekme uz sporu daudzumu gaisa paraugos

Stends	1 h	2 h
AER	4.26 ± 1.15 k.v.v/plate	10.58 ± 3.69 k.v.v/plate
EXP	1.23 ± 0.35 k.v.v/plate	4.46 ± 1.41 k.v.v/plate
LOG	0.82± 0.26 k.v.v/plate	2.24± 1.37 k.v.v/plate

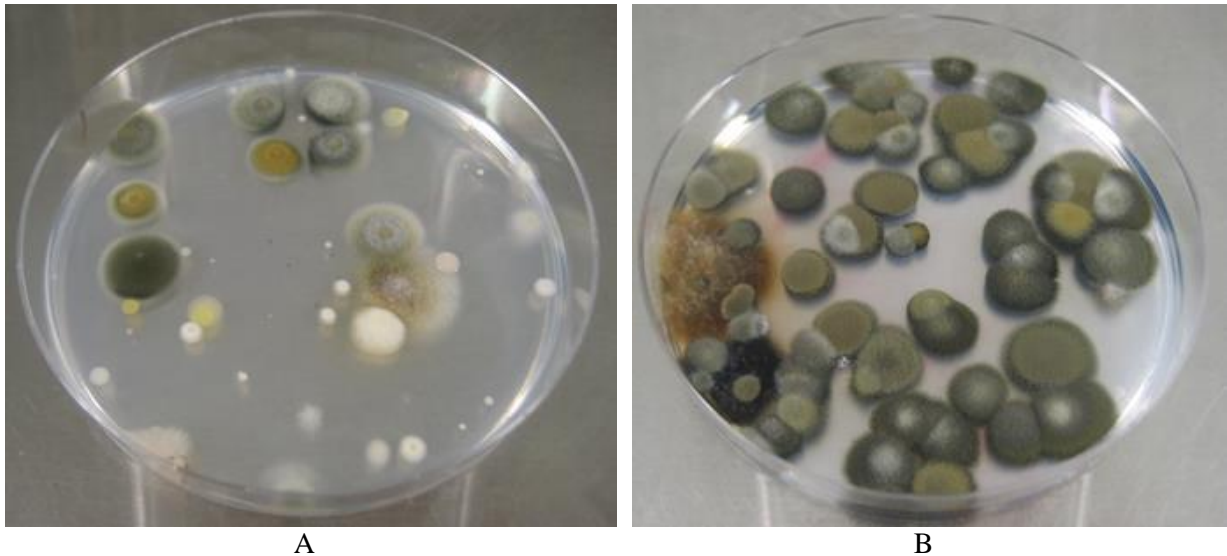
Ventilācijas režīma ietekme. Gaisa padeve standos tiek realizēta caur kondicionieriem, kas aprīkoti ar filtriem, kas palīdz attīrīt ieplūstošo gaisu no dažādām mikroskopiskām daļiņām. Testa standos gaisa apmaiņa, darbinot ventilācijas sistēmu normālā režīmā, ir aptuveni 0.45 h⁻¹. Šādos apstākļos, aprobējot metodiku, arī tika ņemti visi gaisa paraugi.

Lai novērtētu kā gaisa mikrobioloģisko piesārņojumu ietekmē telpu ventilācija un vai pamata ventilācijas režīms ir optimāls veicamajiem pētījumiem, papildus tika paņemti paraugi kondicionierim darbojoties ar apm. 2 reizes lielāku jaudu - nodrošinot gaisa apmaiņu apm. 0.80 h^{-1} . Iegūtie rezultāti ir atspoguļoti 2. tabulā. Standarta apstākļos (0.45 h^{-1}) iegūtie rezultāti ir apkopoti 10.3. tabulā.

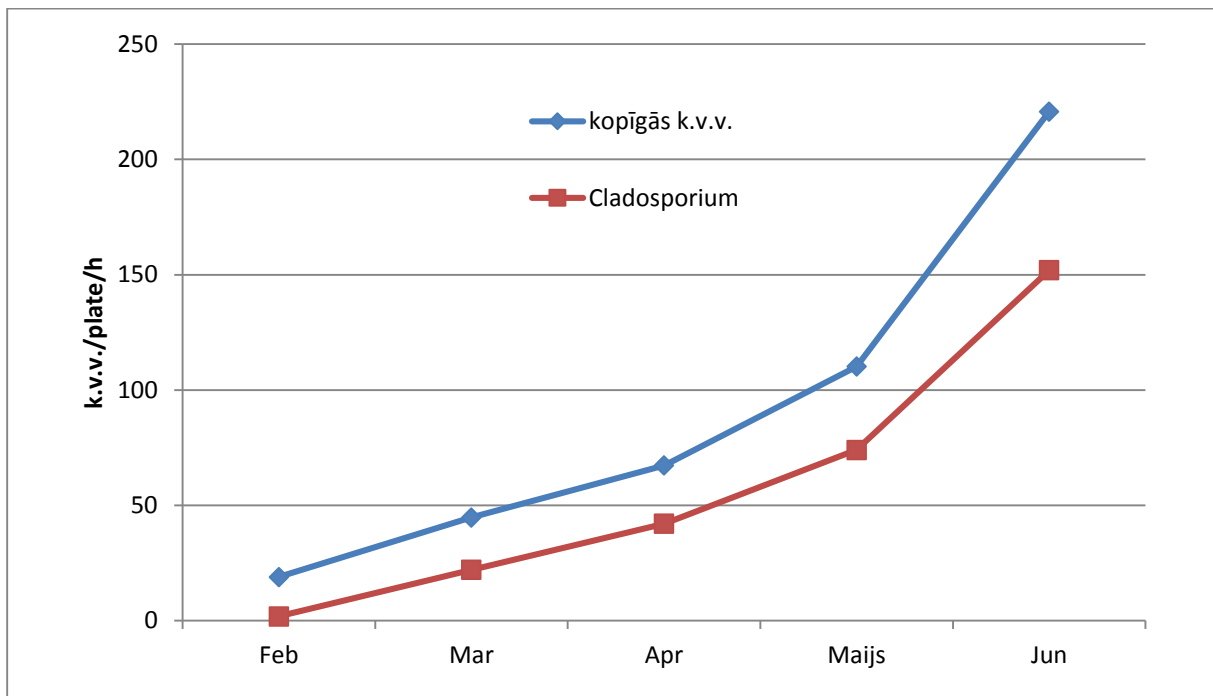
2.tabula. Gaisa paraugi (k.v.v./plate/h), kas ņemti pastiprinātas ventilācijas apstākļos (0.80 h^{-1})

	AER	CER	EXP	LOG	PLY
<i>Aspergillus</i>	0.2	0	0.2	0	0.1
<i>Cladosporium</i>	15.0	23.5	16.3	18.5	20.3
<i>Penicillium</i>	0	0	0.1	0	0.2
Citas	1.5	1.5	2.0	1.0	1.5
Kopā	16.7	25.0	18.6	19.5	22.1

Iegūtie rezultāti parādīja, ka standarta apstākļos (3. tabula) gaisa kondicioniera filtri nodrošināja efektīvu gaisa attīrīšanu no mikrobioloģiskā piesārņojuma. Par to liecina gan kopīgais koloniju veidojošo vienību skaits, gan arī paraugos noteiktās mikrofloras kvalitatīvais sastāvs. Ventilāciju palielinot apm. divas reizes, iekštelpu gaisā līdz pat 10 reizēm pieauga āra gaisā dominējošās sēņu ģints *Cladosporium* sporu skaits (1. attēls). Šādu rezultātu nevar izskaidrot tikai ar gaisa plūsmas ātruma pieaugumu, un tas varētu liecināt, ka pie kondicionieru maksimālās darbības jaudas gaisa filtri vairs nespēj tik efektīvi attīrīt iepūstošo āra gaisu kā strādājot pie režīma 0.45 h^{-1} . Pastiprinātas ventilācijas apstākļi gan nepazemina iekštelpu gaisa kvalitāti, tomēr šāds režīms nav piemērots iekštelpu gaisa piesārņojuma novērtēšanai.

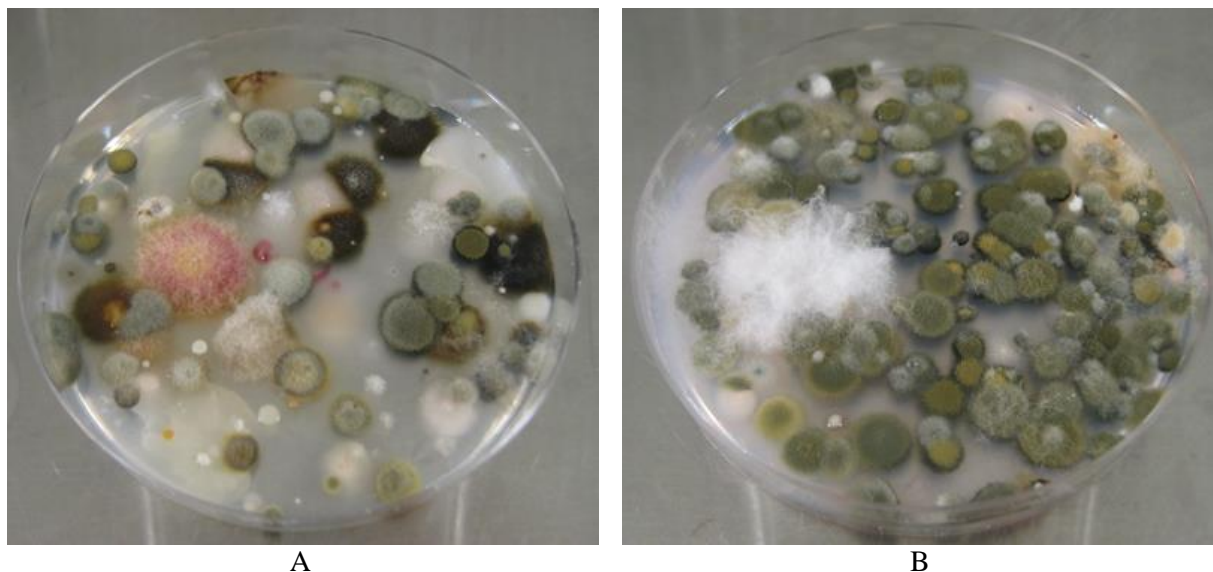


Attēls 1. Gaisa paraugi AER stendā pie dažādiem ventilācijas režīmiem: A – gaisa apmaiņa 0.45 h^{-1} ; B – gaisa apmaiņa 0.80 h^{-1} .



Attēls 2. Mikrofloras koncentrācijas sezonālās izmaiņas āra gaisā.

Āra gaisa paraugi tika ņemti paralēli telpu gaisa paraugiem, lai noteiktu pastāvošo mikrofloras piesārņojuma fonu (2. Un 3. attēls). Grafikā redzams ievērojams sezonāls mikrobioloģiskā piesārņojuma pieaugums, kas ir raksturīgs mērenā klimata joslā. Dominējošās ģints *Cladosporium* koncentrācija gaisā pieaug no apmēram 10% februārī līdz gandrīz 75% jūnijā. Šī āra gaisa paraugu analīze palīdzēja novērtēt kondicionētāju gaisa filtru darbības efektivitāti un āra gaisam raksturīgāko ģinšu klātbūtni iekštelpu gaisa paraugos.



Attēls 3. Āra gaisa paraugu piemēri. Paraugi ņemti: A - maijā, B – jūnijā. Ekspozīcijas laiks 30 min.

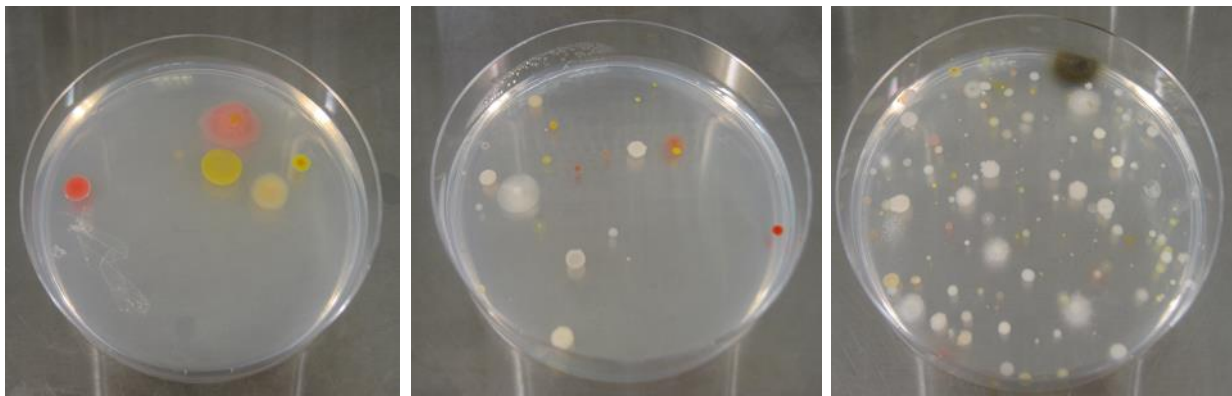
3. tabula. Mikrofloras sastāvs un tā koncentrācija (k.v.v/plate/h) testa stendu gaisa paraugos.

Fungi	AER	CER	EXP	LOG	PLY
<i>Alternaria</i>	0.13 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.03	0.02 ± 0.02	0.05 ± 0.05
<i>Aspergillus</i>	1.50 ± 0.68	0.00 ± 0.00	0.22 ± 0.09	0.04 ± 0.02	0.00 ± 0.00
<i>Aureobasidium</i>	0.07 ± 0.05	0.20 ± 0.04	0.08 ± 0.05	0.12 ± 0.07	0.08 ± 0.05
<i>Cladosporium</i>	1.25 ± 0.49	1.44 ± 0.40	1.10 ± 0.27	1.16 ± 0.36	1.32 ± 0.44
<i>Geomyces</i>	0.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>Geotrichum</i>	0.04 ± 0.04	0.03 ± 0.03	0.10 ± 0.05	0.05 ± 0.05	0.00 ± 0.00
<i>Gonytrichum</i>	0.13 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>Penicillium</i>	0.65 ± 0.35	0.25 ± 0.06	0.57 ± 0.24	0.15 ± 0.05	0.23 ± 0.10
<i>Zygorhynchus</i>	0.04 ± 0.04	0.07 ± 0.07	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.03	0.07 ± 0.07
Raugi	0.15 ± 0.05	0.13 ± 0.09	0.20 ± 0.08	0.12 ± 0.05	0.15 ± 0.09
Sterili micēliji	0.40 ± 0.15	0.30 ± 0.08	0.18 ± 0.13	0.25 ± 0.20	0.15 ± 0.06
Citas	1.00 ± 0.25	1.02 ± 0.44	0.88 ± 0.66	0.78 ± 0.57	0.80 ± 0.50
Kopā	5.38 ± 1.51	3.44 ± 1.05	3.12 ± 1.11	2.72 ± 1.18	2.85 ± 1.16

Iekštelpas gaisa paraugu kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs. Līdz šim metodes aprobācijas gaitā iegūtie rezultāti parādīti 3. tabulā. Tie apstiprina, ka, pateicoties kondicioniera darbībai (standarta režīmā), āra gaisa bioloģiskā piesārņojuma ietekme uz iekštelpu gaisu ir minimāla. Par to liecina salīdzinoši zemā ģinšu *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium* u.c. (raksturīgas āra gaisam) klātbūtne paraugos un tas, ka šo sēņu koncentrācijā nav būtisku atšķirību starp dažādiem stendiem. Par telpu gaisa piesārņojumu,

kura cēlonis ir pelējumu attīstība telpās, liecina pelējuma sēnes – indikatori: *Aspergillus*, *Penicillium*.

Bakteriālā piesārņojuma noteikšana. Vairākos atkārtojumos tika izmēģināta arī baktēriju kopējā skaita noteikšana iekštelpu gaisā, kā kultivēšanas substrātu izmantojot barotni R2A. Bakterioloģisko telpas piesārņojumu dažreiz iesaka veikt paralēli mikrofloras analīzei, lai iegūtu pilnīgāku priekšstatu par gaisa kvalitāti. Tomēr esošajos apstākļos, lai raksturotu izmantoto būvmateriālu ietekmi uz mikroorganismu attīstību telpā, no baktēriju analīzes vajadzēja atteikties, jo vairāki blakus faktori traucēja iegūt korektus rezultātus. Piemēram, viens no būtiskiem baktēriju avotiem telpās ir cilvēku klātbūtne (kaut arī epizodiska). Dažādos stendos ievērojami atšķirās laiks, kur tajos uzturas cilvēki. Piem., CER stendā – signalizācijas ieslēgšana/izslēgšana; EXP stendā – jaunu iekārtu uzstādīšana utt. Bija sagaidāms, ka lielāks baktēriju daudzums būs AER stendā, kur ir lielāks gaisa mitrums, tomēr bakteriālais piesārņojums būtiski augstāks bija EXP stendā, kur ilgstoši šajā periodā uzturējās cilvēki (10.4., 10.5. att.). Pie paraugu ņemšanas apstākļu saskaņošanas šādā aspektā vēl jāstrādā.



A – LOG stends

B – AER stends

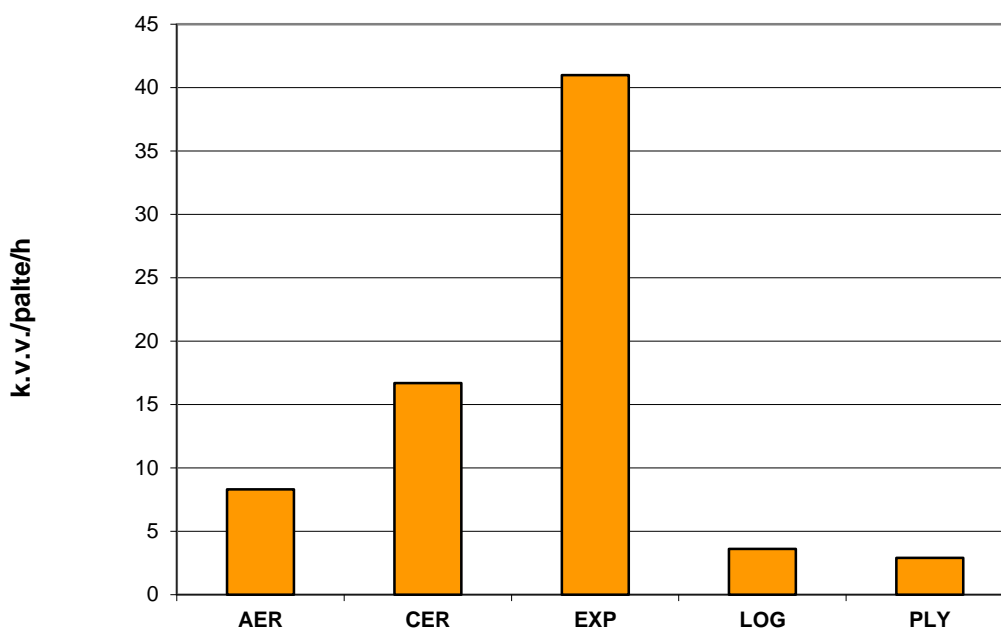
C – EXP stends

Attēls 4. Atšķirīgais baktēriju daudzums dažādu stendu gaisa paraugos (eksponācijas laiks 1 h).

Arī telpu uzkopšanas pasākumi (grīdu slaucīšana, mazgāšana) būtiskāk ietekmēja tieši bakteriālo piesārņojumu stendos, piem., EXP stendā baktēriju daudzums

- pirms mitrās stendu uzkopšanas bija - 136 ± 49 ;
- pēc mitrās stendu uzkopšanas bija - 11 ± 5 .

Tāpēc tika nolemts mikrobioloģiskā piesārņojuma analīzei turpmāk noteikt tikai mikroskopisko sēņu klātbūtni stendos.



Attēls 5. Noteiktais baktēriju daudzums testa standu gaisa paraugos.

2. Virsmas paraugu ņemšana ar „nomazgājuma” metodi

Ar sterilā destilētā ūdenī samitrinātu vates tamponu tika notīrīta 10 cm² liela virsma un pārnesta 1.0 ml sterila ūdens. No iegūtā šķīduma 100μl uznes un izlīdzina uz Petri plates, kas pildīta ar barotni. Pēc apmēram 2 nedēļām saskaita un identificē izaugušās sēņu kolonijas. Minimālais atkārtojumu skaits - 4. Paraugu nomazgāšanas metode parādīta 6. attēlā.

Metodes pārbaudei paraugi vispirms tika ņemti no 3 stendiem: AER, EXP, LOG - katrā stendā paņemot 6 paraugus.

AER stendā tika ņemti:

- 3 paraugi no virsmām ar jau redzamām pelējuma sēnīšu kolonijām (7. attēls),
- 3 paraugi kontrolei - apm., 1-1.5 m attālumā no redzamās pelējumu zonas.

EXP un LOG stendos tika ņemti:

- 3 paraugi no potenciālām riska zonām (piem., apakšējie telpu stūri),
- 3 paraugi kontrolei – apmēram no tām pašām vietām, kur AER stendā.



Attēls 6. Paraugu ņemšanas piemērs no virsmām.

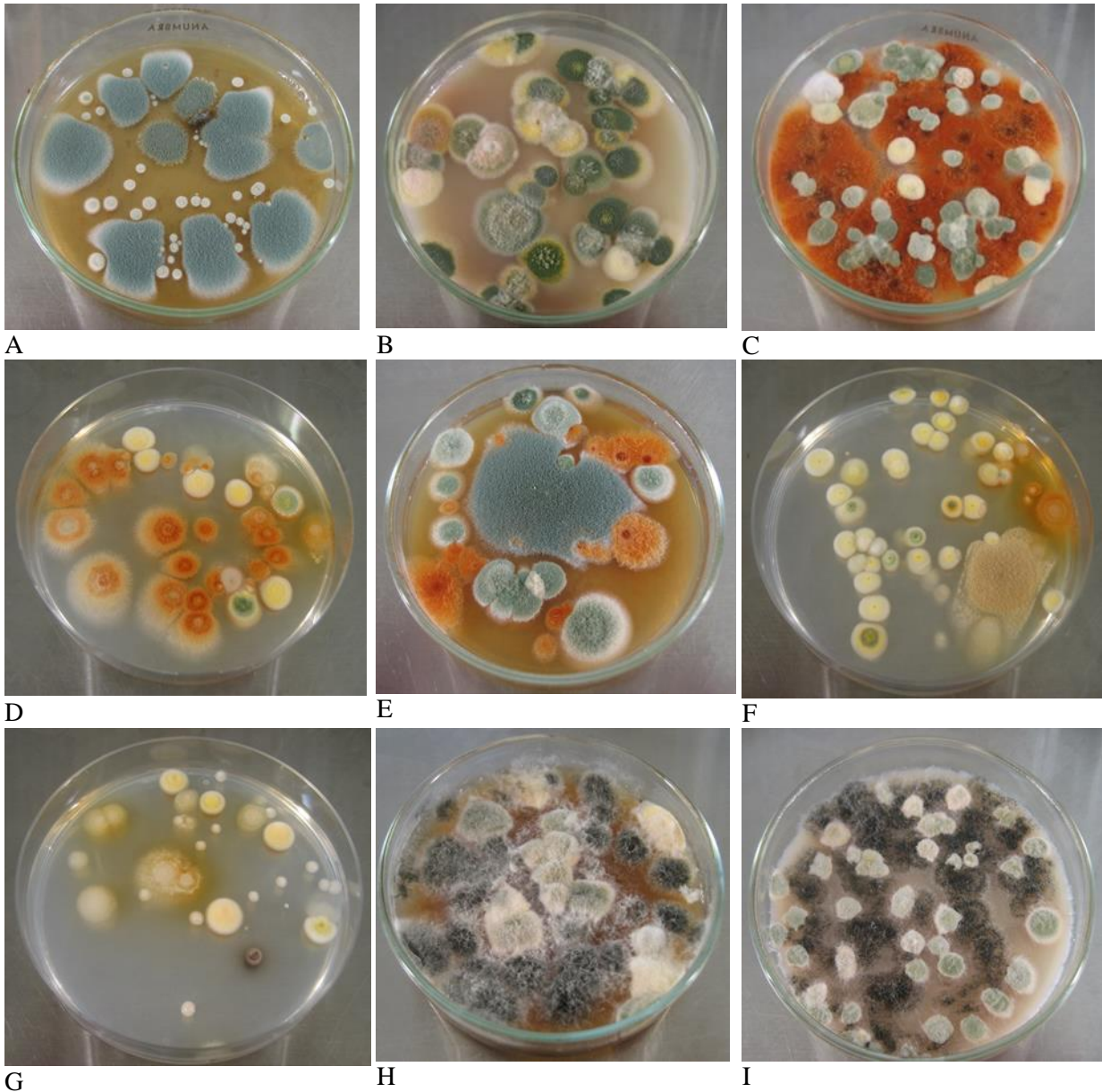


Attēls 7. Ar pelējuma sēnīšu kolonijām klātās virsmas AER stendā, kur tika ņemti paraugi.

Tika konstatēts, ka paraugus, kas iegūti no vizuāli tīrām virsmām, nav nepieciešams atšķaidīt, lai korekti varētu saskaitīt izaugušās sēņu kolonijas, bet paraugi, kas ņemti AER stendā no pelējumu klātām virsmām ir jāatšķaida līdz 10^{-2} – 10^{-5} , lai varētu iegūt optimālu informāciju par sēņu sporu koncentrāciju tajos.

Tipiskākas sēnes, kas konstatētas uz virsmām ir sekojošas:

- AER stendā: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Acremonium* u.c. (8. attēls);
- EXP stendā: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geomyces* u.c.;
- LOG stendā: netika konstatēts būtisks mikrobioloģiskais piesārņojums.



Attēls 8. Dažas tipiskas pelējuma sēnes no AER stenda virsmu paraugiem: A – *Penicillium* un *Aspergillus*; B – *Aspergillus*; C, D – *Verticillium* un *Aspergillus*; E – *Verticillium*, *Aspergillus* un *Penicillium*; F – *Aspergillus*, *Acremonium*, *Verticillium* un *Penicillium*; G – *Aspergillus* un *Acremonium*; H, I – *Aspergillus* un *Gonytrichum*.

Secinājumi

Kopumā no veiktajiem izmēģinājumiem, to novērtējuma un iegūtajiem rezultātiem var secināt, ka abas izvēlētās metodes (sedimentācijas plates un “nomazgājuma” metodes) var efektīvi izmantot, lai novērtētu mikrobioloģisko piesārņojumu pētāmajos objektos – telpu gaisā un uz būvkonstrukciju virsmas. Tādēļ tās, ņemot vērā iegūto pieredzi un ierobežojošos faktorus, tiek izmantotas projektā turpmākajos kvalitatīvajos un kvantitatīvajos mikrobioloģiskajos pētījumos.