

Katarzyna SADOWIEC*, Beata ZIELIŃSKA-POLIT, Stefan RUSSEL

OCENA LICZEBNOŚCI BAKTERII *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* W POWIETRZU W WYBRANYM BUDYNKU INWENTARSKIM

W polskim prawodawstwie brakuje norm dotyczących dopuszczalnych ilości bakterii w powietrzu pomieszczeń zamkniętych. Nieaktualna już norma z 1989 roku (PN-89 Z-04111/02) dotyczyła powietrza atmosferycznego i podawała *Pseudomonas fluorescens* jako jedną z bakterii wskaźnikowych, dlatego wybrano tę bakterię do niniejszych badań. *Pseudomonas fluorescens* nie jest szkodliwa dla zdrowych osób, jednak u chorych z upośledzoną odpornością może powodować ciężkie schorzenia. Przez rok prowadzona była ocena ilościowa *P. fluorescens* w powietrzu wybranego budynku inwentarskiego. Sześć analiz wykazało, że największa koncentracja tej bakterii przypadała na miesiące letnie i wiosenne, wewnątrz pomieszczeń. Najwyższa odnotowana wartość to $356 \text{ JTK}\cdot\text{m}^{-3}$ w lipcu, 0,5m po wejściu do obory. Na zewnątrz koncentracja bakterii była mniejsza (od 0 do $66 \text{ JTK}\cdot\text{m}^{-3}$), co pokazuje jak budynki inwentarskie oddziałują na otoczenie i środowisko.

1. WSTĘP

W 2011 roku do najczęściej stwierdzanych chorób zawodowych w Polsce należały pylice płuc (27,5%), choroby zakaźne lub pasożytnicze albo ich następstwa (25,3%), obustronny trwały ubytek słuchu (10,1%), przewlekłe choroby narządu głosu spowodowane nadmiernym wysiłkiem głosowym (8,9%), przewlekłe choroby obwodowego układu nerwowego (7,1%), przewlekłe choroby układu ruchu (3,9%), nowotwory (3,8%), choroby skóry (3,2%), zespół wibracyjny (3,1%), astma oskrzelowa (1,8%) [12]. Stan powietrza w środowisku pracy ma istotny wpływ na zdrowie pracowników, dotyczy dwóch najczęściej stwierdzanych chorób zawodowych, które mogą być spowodowane zbyt dużym stężeniem pyłów i drobnoustrojów chorobotwórczych w powietrzu. Do alergii skórnych i astmy oskrzelowej przyczynić się mogą obecne w po-

* Instytut Technologiczno-Przyrodniczy w Falentach, 05- 090 Raszyn, Al. Hrabka 3, k.sadowiec@wp.pl

wietrze mykotoksyny i endotoksyny. Narażenie w środowisku pracy na czynniki biologiczne, w tym na bakterie i grzyby, jest powszechne i może powodować szereg negatywnych skutków zdrowotnych, m.in. infekcje, choroby zakaźne, reakcje alergiczne, reakcje toksyczne, czy syndromy związane z jakością środowiska wewnątrz budynków, powodując tzw. Syndrom chorego budynku (SDS, ang. sick building syndrome). Najbardziej powszechne i niebezpieczne są zagrożenia na stanowiskach pracy, gdzie drobnoustroje, jako składnik bioaerozolu, przenoszą się drogą powietrzno-kropelkową lub powietrzno-pyłową i wnikają do organizmu m.in. przez skórę czy drogi oddechowe.

Rozporządzenie ministra zdrowia z dnia 22.04.2005 roku wskazuje pracę w rolnictwie i hodowli jako pracę o podwyższonym ryzyku pod względem narażenia na szkodliwe działanie czynników biologicznych [4]. Zawodowe narażenie na pyły organiczne powoduje częste występowanie chorób układu oddechowego i skóry. Wyróżnia się kilka chorób uznanych za choroby zawodowe rolników np. płuco hodowców ptaków, płuco farmera. Dbałość o higienę i czystość, odpowiednie systemy wentylacji, odpowiednie przystosowanie pomieszczeń do przechowywania produktów rolnych, a także stosowanie środków ochrony osobistej są najskuteczniejszymi sposobami ograniczenia konsekwencji złego stanu mikrobiologicznego powietrza pomieszczeń inwentarskich.

W Polsce brak norm dotyczących dopuszczalnych ilości bakterii i grzybów w powietrzu pomieszczeń zamkniętych, a obowiązujące do niedawna normy z 1989 dotyczące dopuszczalnych stężeń bakterii PN-89 Z-04111/02 [8] i grzybów PN-89 Z-04111/03 [9] w powietrzu atmosferycznym nie zostały zastąpione nowymi.

Pałeczki z rodzaju *Pseudomonas* to jedna z liczniejszych grup drobnoustrojów. Są to biegunowo orzęsione, Gram-ujemne pałeczki należące często do skrajnie różniących się pod względem fizjologicznym rodzajów. Pałeczki *Pseudomonas fluorescens* są tlenowcami. Szczepy *Pseudomonas* mogą powodować zakażenia dróg oddechowych i moczowych, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, kości, szpiku, stawów, oka, ucha. Są przyczyną: ropni, zapalenia osierdzia, wśierdzia, czasem zatruc pokarmowych. Ze względu na małe wymagania spotyka się je w wodzie, w glebie, w ściekach i w powietrzu. Zwykle jako pierwsze zasiedlają nowe miejsca, jeżeli zawierają one sole mineralne i kwasy organiczne lub cukry [10].

Pseudomonas fluorescens była uważana za bakterię niepatogenną dla człowieka do 1953 roku, kiedy Pittman opisał sześć szczepów z cechami *Pseudomonas fluorescens*, które przedostały się do organizmu podczas transfuzji krwi i spowodowały ciężkie śmiertelne reakcje biorców. W 1958 roku opisano infekcje dróg moczowych i zakażenie rany spowodowane *P. fluorescens* [11]. Długo nie było jednomyślności, co do zjadliwego dla organizmu człowieka znaczenia *P. fluorescens*. Obecnie wiadomo, że dla zdrowych osób pałeczki *P. fluorescens* są nieszkodliwe, są także składnikami prawidłowej mikroflory organizmu, jednak mogą występować jako bakterie oportuni-

styczne i powodować ciężkie schorzenia u ludzi osłabionych lub z niedoborem odporności lub jeżeli przedostaną się do przestrzeni, gdzie normalnie nie występują [10].

Badania nad *Pseudomonas fluorescens* są w dalszym ciągu prowadzone. W 2012 roku opublikowano wyniki badań [1] opisujące wybuch infekcji *Pseudomonas fluorescens* u sześciu pacjentów w terapii wieńcowej. Źródłem tej infekcji okazała się kąpiel w wodzie z lodem, stosowana leczniczo w tej chorobie. Wcześniej nie zgłaszano takich przypadków. Jednak bakterie te wchodzą często w skład mikroflory produktów chłodzonych i mrożonych, powodując ich psucie się. Ogniska *P. fluorescens* okazjonalnie opisywano w odniesieniu do zakażeń spowodowanych transfuzją krwi i zakażeniem krwioobiegu.

Bakteria *Pseudomonas fluorescens* widniała w normie PN-89 Z-04111/02 [8] jako jedna z bakterii wskaźnikowych i dlatego wybrano tę bakterię do niniejszych badań, których celem było sprawdzenie, jakie stężenia tej bakterii będą obecne na różnych stanowiskach w budynku inwentarskim i jak będą się zmieniać w zależności od miesiąca.

2. MATERIAŁY I METODY

Badano liczebność bakterii *Pseudomonas fluorescens* w powietrzu wybranego budynku inwentarskiego od lipca 2012 roku do maja 2013 roku. Budynkiem, w którym przeprowadzono analizy była obora o obsadzie około 70 młodych krów (w tym półroczne cielęta, roczne i dwuletnie jałówki) w województwie mazowieckim. Wytypowanych zostało pięć stanowisk, przy wyborze których kierowano się kryterium odpowiedniego ich zróżnicowania, pod względem kontaktu z powietrzem zewnętrznym.

Stanowiska badawcze (rys. 1):

1. 50 m od obory
2. 0,5 metra przed wejściem do obory
3. 0,5 metra po wejściu do obory
4. 25 m od wejścia do obory
5. 50 m od wejścia do obory



Rys. 1. Stanowiska badawcze [Google maps 2014, opracowanie własne]

Próbki potrzebne do oznaczania ilościowego *Pseudomonas fluorescens* pobrane zostały metodą zderzeniową przy pomocy urządzenia Mass 100 EKO Air Sampler firmy Merck. Metoda ta polega na zasysaniu przez aspirator znanej objętości powietrza, które z dużą szybkością uderza w powierzchnię pożywek agarowych. Powoduje to przyklejanie się obecnych w powietrzu drobnoustrojów, które po określonym czasie inkubacji wytwarzają kolonie. Próbki pobrano w trzech powtórzeniach. Zastosowano pożywkę Kinga B, odpowiednią dla bakterii *Pseudomonas fluorescens*. Na podłożu Kinga B wytwarzają one barwniki fluoryzujące, które powodują świecenie kolonii w świetle UV. Po inkubacji w temperaturze 37°C przez 5 dni, zliczono wyrosłe kolonie, a następnie otrzymane dane podstawiono do wzoru na liczbę bakterii zawartą w 1m³ powietrza - uzyskano liczbę mikroorganizmów przypadającą na jednostkę objętości powietrza (JTK·m⁻³):

$$A = a \cdot [1000 / (V \cdot t)],$$

gdzie:

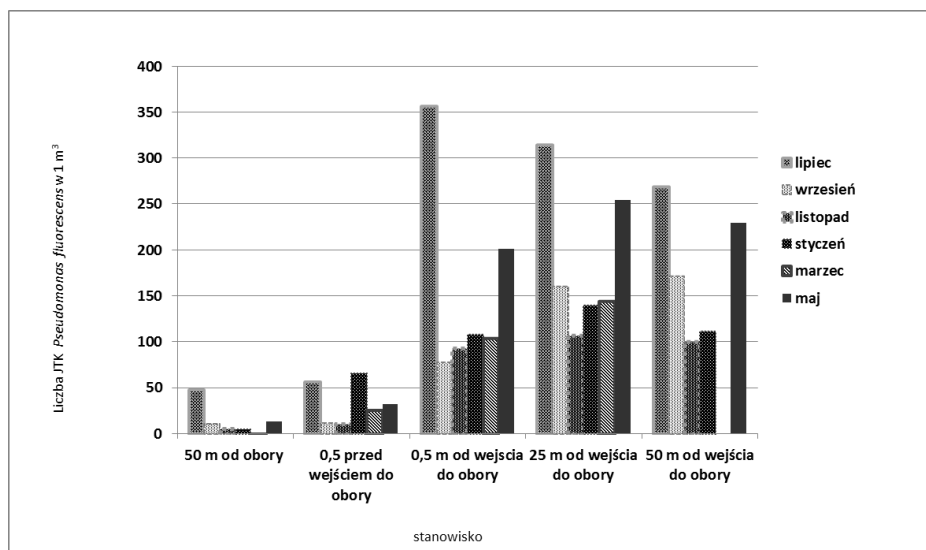
- A - liczba Jednostek Tworzących Kolonie – JTK (CFU, Colony Forming Units) w 1m³,
- A - liczba kolonii w 10 l powietrza,
- V - objętość pobieranej próbki powietrza w czasie jednej minuty w l/min, w tym wypadku zawsze 100 l,
- t - czas pobierania próbki powietrza w min, w tym wypadku 6 sekund czyli 0,1 minuty.

3. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Analiza ilościowa powietrza pod względem mikrobiologicznym została przeprowadzona w celu stwierdzenia zależności liczebności *Pseudomonas fluorescens* w powietrzu pomieszczeń inwentarskich oraz ich otoczeniu od rodzaju stanowiska i terminu przeprowadzenia analizy.

Podczas sześciu pomiarów, od lipca 2012 roku do maja 2013 roku, sprawdzono zmiany liczby *Pseudomonas fluorescens* na poszczególnych stanowiskach. Największa ich koncentracja w powietrzu obory przypada na miesiące wiosenne i letnie. Największe ilości *Pseudomonas fluorescens* (356 JTK·m⁻³) odnotowano w lipcu (rys. 2), gdy temperatura powietrza na zewnątrz wahała się w granicach 30°C. Średnio najmniej *Pseudomonas fluorescens* było w listopadzie, a najmniejszą ich ilość odnotowano w marcu 50 m od budynku (0 JTK·m⁻³). Punkty zlokalizowane na środku pomieszczeń inwentarskich cechuje wyraźnie większa koncentracja mikroorganizmów niż punkty położone bliżej drzwi lub na zewnątrz budynku. Na stanowiskach 2-5 największa koncentracja badanych bakterii przypadała na lipiec. Bardzo dużo

Pseudomonas fluorescens w tych punktach pomiarowych odnotowano również w maju. Tuż przed wejściem do obory najwięcej *P. fluorescens* było w styczniu. Zmienne warunki, przede wszystkim ruch powietrza, mają wpływ na wyniki pomiarów.



Rys. 2. Liczba JTK bakterii *Pseudomonas fluorescens* w 1 m^3 powietrza na poszczególnych stanowiskach w zależności od miesiąca

Nieaktualna już norma PN-89 Z-04111/02 [8], dotycząca dopuszczalnych ilości bakterii w powietrzu atmosferycznym wskazuje, że zawartość *Pseudomonas fluorescens* w ilości $50 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$ i poniżej to powietrze średnio zanieczyszczone, a powyżej $50 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$ to powietrze silnie zanieczyszczone. Jedynie brak *Pseudomonas fluorescens* w powietrzu atmosferycznym oznacza powietrze czyste. Najmniejszy z uzyskanych wyników to właśnie $0 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$ i odnotowano go w marcu, $0,5 \text{ m}$ od wejścia do obory. Niewiele więcej, bo $1 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$, odnotowano w tym samym miesiącu 50 m od obory, ale to według tej klasyfikacji, wskazuje już na powietrze średnio zanieczyszczone. Od lipca do maja, 50 m od wejścia do obory, oraz we wrześniu, listopadzie, marcu i maju, $0,5 \text{ m}$ przed wejściem do obory wyniki nie przekraczały $50 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$. Natomiast na pozostałych stanowiskach odnotowano dużą ilość $\text{JTK} \cdot \text{m}^{-3}$, poza marcem, gdy powietrze było wolne od *Pseudomonas fluorescens*. Powyższe wyniki pokazują jak duże stężenia *P. fluorescens* obecne są w środowisku pracy rolników oraz, jak budynek inwentarski oddziałuje na środowisko (na zewnątrz dochodziło do $66 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$).

Brak badań dotyczących występowania *Pseudomonas fluorescens* w powietrzu budynków inwentarskich. Dla porównania, badając powietrze przy oczyszczalni ścieków

w okresie letnim, uzyskano podobne ilości *Pseudomonas fluorescens* [2] jak w przypadku stanowisk w otoczeniu obory. Największa koncentracja tych bakterii była przy piaskownikach i przekraczała $50 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$, co wg normy z 1989 roku jest powietrzem silnie zanieczyszczonym, w pozostałych punktach powietrze było średnio zanieczyszczone, poniżej $10 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$. Najmniej, bo $5 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$, było przy komorach napowietrzających i poza terenem oczyszczalni.

Badano stan sanitarny powietrza w otoczeniu innej oczyszczalni ścieków i bakterie *Pseudomonas fluorescens* najliczniej występowały w powietrzu latem, natomiast w pozostałych porach roku stwierdzono ich niewielką liczbę. Latem na strzech stanowiskach stwierdzono silne zanieczyszczenie tymi bakteriami (powyżej $50 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$), wiosną na jednym stanowisku [6].

Zespół Ekspertów ds. Czynników Biologicznych Międzyresortowej Komisji ds. NDS i NDN przedstawił propozycje zakresów wartości dopuszczalnych stężeń szkodliwych czynników biologicznych w pomieszczeniach zamkniętych. Dotyczą one przyjęcia zalecanych wartości dopuszczalnych stężeń najbardziej powszechnych kategorii mikroorganizmów i endotoksyn bakteryjnych w powietrzu pomieszczeń roboczych oraz mieszkalnych i użyteczności publicznej. W przypadku bakterii Gram-ujemnych zaproponowano próg $20000 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$ dla pomieszczeń roboczych zanieczyszczonych pyłem organicznym. $20000 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$ jako propozycję dopuszczalnego stężenia bakterii Gram-ujemnych w powietrzu podali również Dutkiewicz, Mołocznik [3], Górny, Dutkiewicz [5]. Przedstawione zostały również propozycje indywidualne lub grup badaczy wartości normatywnych dla bakterii Gram-ujemnych: Clark (1985) podaje $1000 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$, jako bezpieczne stężenie w powietrzu pomieszczeń produkcyjnych. Tę samą ilość $\text{JTK} \cdot \text{m}^{-3}$ podają Malmros i in. [7] jako wartość progową dla narażenia zawodowego. Jednak są to propozycje dla ogółu bakterii Gram-ujemnych w powietrzu. Nie znana jest dopuszczalna liczebność *Pseudomonas fluorescens* w powietrzu pomieszczeń inwentarskich, ale na pewno ten próg musi być wyższy niż dla powietrza atmosferycznego, ponieważ same zwierzęta, ich ściółki i pasze są źródłem bioaerozolu.

LITERATURA

- [1] BENITO N., MIRELIS B., LUZ GÁLVEZ, VILA M., LÓPEZ-CONTRERAS J., COTURA A., POMAR V., MARCH F., NAVARRO F., COLL P., GURGUÍ M., *Outbreak of Pseudomonas fluorescens bloodstream infection In a coronary care unit*, [w:] Journal of Hospital Infection, 2012, Nr 82, s. 286-289.
- [2] BREZA-BORUTA B., *Ocena mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza na terenie oczyszczalni ścieków*, Woda – Środowisko - Obszary Wiejskie, 2010, t. 10 z. 3 (31) s. 52-52.
- [3] DUTKIEWICZ J., MOŁOCZNIK A., *Zweryfikowana dokumentacja NDS dla pyłów pochodzenia roślinnego i zwierzęcego*, Lublin, Instytut Medycyny Wsi, 1993.

- [4] Dz. U. Nr 81, poz. 716, Rozporządzenie 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.
- [5] GÓRNY R.L., DUTKIEWICZ J., *Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries*, Ann. Agric. Environ. Med., 2002, Vol. 9, s. 17-23
- [6] KOŁWZAN B., JADCZYK P., PASTERNAK G., GŁUSZCZAK J., PAWLIK M., KRAWCZYŃSKA M., KLEIN J., RYBAK J., *Ocena stanu sanitarnego powietrza w otoczeniu wybranej oczyszczalni ścieków*, Ochrona środowiska, 2012, vol. 34, nr 2, s. 10-13.
- [7] MALMROS P. I IN., *Occupational health problems due to garbage sorting*, Waste Management Res., 1992, Vol. 10, s. 227-234.
- [8] Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną PN-89 Z-04111/02, Polski Komitet Normalizacji, Miar i Jakości, 1989.
- [9] Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby grzybów mikroskopowych w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną PN-89 Z-04111/03, Polski Komitet Normalizacji, Miar i Jakości, 1989/38
- [10] VIRELLA G., *Mikrobiologia i choroby zakaźne*, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 1999.
- [11] VON GRAEVENITZ A., WEINSTEIN J., *Pathogenic significance of Pseudomonas fluorescens and pseudomonas putida*, Section of Laboratory Medicine, Yale University School of Medicine and Clinical Microbiology Laboratories, Postdoctoral Fellow, 1970, s. 256-273.
- [12] WALUSIAK-SKORUPA J., Instytut Medycyny Pracy w Łodzi, praca i zdrowie 3/2013 <http://www.pracaizdrowie.com.pl/content/view/1498/6/>
- [13] Mapy Google: <http://www.google.pl/maps/>

THE EVALUATION OF *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* CONCENTRATION IN THE AIR OF SELECTED LIVESTOCK BUILDING

In Poland there is lack of regulations regarding to admissible concentration of bacteria in the indoor air. *Pseudomonas fluorescens* was one of the indicator bacteria in the outdated outdoor air Polish standard from 1989, which is why it was chosen for this study of the indoor air. *P. fluorescens* usually doesn't cause disease in humans, it affects patients with compromised immune systems. Although too high contamination of such bacteria in the air of working area isn't appreciated. The amount of *P. fluorescens* bacteria in the air of the working environment in selected rooms of chosen livestock building was assessed for a period of one year. The evaluation of the quantity of this kind of air microflora is the aim of the project. Six analysis showed that the concentration of *P. fluorescens* was higher in the summer and spring months in the indoor air. The outdoor air was much more cleaner, but still the amount of this bacteria was big and that showed how livestock buildings can affect surrounded area and the environment.