

## Metoda pomiaru stopnia inaktywacji promieniowaniem UV-C mikroorganizmów zawieszonych w powietrzu

### Badane drobnoustroje

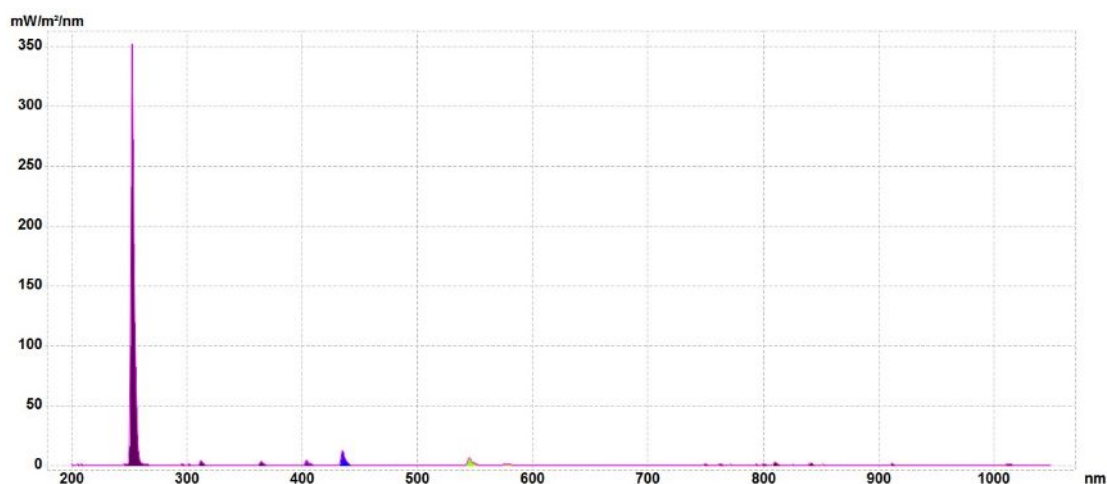
Do badania inaktywacji promieniowaniem UV-C mikroorganizmów zawieszonych w powietrzu należy wykorzystać drobnoustroje reprezentujące trzy grupy, np. spośród bakterii szczepy wzorcowe: ziarniaka Gram-dodatniego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, który jest patogenem ludzkim zaklasyfikowanym do grupy 2. zagrożenia zarówno przez Dyrektywę Komisji (UE) 2019/1833 z dnia 24 października 2019r. (zmieniającej m.in. Załącznik III do Dyrektywy Parlamentu Europejskiego 2000/54/WE oraz Rady w sprawie wykazu czynników biologicznych o znanej zakaźności dla człowieka), jak i w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 11 grudnia 2020r. (w sprawie czynników biologicznych szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy i ochrona zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki); laseczki Gram-dodatniej *Bacillus subtilis* ATCC 6633 mającej zdolność tworzenia endospor, powszechnie występującej w produktach roślinnych i zwierzęcych, która u osób narażonych na działanie pyłu zawierającego te bakterie może być odpowiedzialna za niekorzystne skutki zdrowotne w postaci alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych, objawów astmatycznych czy zapalenia skóry; pałeczki Gram-ujemnej *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 260 szeroko rozpowszechnionej m.in. w glebie, wodzie, materii roślinnej, ale i w środowisku szpitalnym, gdzie jest traktowana jako patogen oportunistycznymi odporny na wiele antybiotyków i środków dezynfekcyjnych; spośród wirusów szczep wzorcowy bakteriofaga PhiX174 ATCC 13706-B1, który jest wirusem modelowym w badaniach laboratoryjnych wymagających żywych nanocząstek biologicznych (m.in. jako substytut patogenów wirusowych, np. wirusa SARS-CoV-2, w badaniach związanych z infekcjami dróg oddechowych); spośród grzybów pleśń *Aspergillus versicolor* ATCC 9577, która jest źródłem mykotoksyn, a inhalacja jej konidiów może u narażonych osób skutkować wystąpieniem reakcji alergicznych.

### Badane promienniki UV-C

Do badania inaktywacji promieniowaniem UV-C mikroorganizmów zawieszonych w powietrzu należy wykorzystać co najmniej dwa promienniki, tj. promiennik świetlówkowy (np. model G15T8) oraz promiennik UV-C LED (np. model UVM002A-0401U1-RM). Promiennik świetlówkowy model G15T8 (Sankyo Denki Co., Ltd., Kanagawa, Japonia) (ryc. 1) wyposażony jest w niskociśnieniową lampę rtęciową o mocy 15W. Widmo promiennika przedstawiono na rycinie 2, a natężenia napromienienia promieniowaniem z zakresu UV wraz z ekspozycją obliczoną dla 20min czasu naświetlania próbki dla 3 testowanych odległości pomiarowych (patrz poniżej) przedstawiono w tabeli 1.



**Rycina 1.** Promiennik świetlówkowy model G15T8 (Sankyo Denki Co., Ltd., Kanagawa, Japonia).



**Rycina 2.** Widmo promiennika świetłkowego model G15T8 (Sankyo Denki Co., Ltd., Kanagawa, Japonia).

**Tabela 1.** Natężenie napromienienia promieniowaniem z zakresu UV i ekspozycja (20min) obliczone dla promiennika świetłkowego model G15T8 (Sankyo Denki Co., Ltd., Kanagawa, Japonia).

Odległość pomiarowa [m]	Natężenie napromienienia promieniowaniem z zakresu UV [W/m <sup>2</sup> ]	Ekspozycja dla 20min (1 200s) [J/m <sup>2</sup> ]
0,5	0,635	762
1,0	0,182	218,4
1,5	0,098	117,6

Z kolei w modułowym promienniku LED model UVM002A-0401U1-RM (Citizen Electronics Co., Ltd., Yamanashi, Japonia) (ryc. 3), źródłem promieniowania UV-C są 4 diody LED o łącznej mocy 9W ułożone w rzędzie w aluminiowym radiatorze. Widmo promiennika UV-C LED przedstawiono na rycinie 4, a natężenia napromienienia promieniowaniem z zakresu UV wraz z ekspozycją obliczoną dla 20min czasu naświetlania próbki dla 3 testowanych odległości pomiarowych podano w tabeli 2.



**Rycina 3.** Modułowy promiennik LED model UVM002A-0401U1-RM (u góry) o łącznej mocy 9W z aluminiowym radiatorem (na dole) (Citizen Electronics Co., Ltd., Yamanashi, Japonia).



**Rycina 4.** Widmo modułowego promiennika UV-C LED model UVM002A-0401U1-RM (złożonego z czterech diod) o łącznej mocy 9W (Citizen Electronics Co., Ltd., Yamanashi, Japonia).

**Tabela 2.** Natężenie napromienienia promieniowaniem z zakresu UV oraz ekspozycja (20min) obliczone dla modułowego promiennika UV-C LED model UVM002A-0401U1-RM (złożonego z czterech diod) o łącznej mocy 9W (Citizen Electronics Co., Ltd., Yamanashi, Japonia).

Odległość pomiarowa [m]	Natężenie napromienienia promieniowaniem z zakresu UV [W/m <sup>2</sup> ]	Ekspozycja dla 20min (1 200s) [J/m <sup>2</sup> ]
0,5	0,686	823,2
1,0	0,224	268,8
1,5	0,104	124,8

#### **Stanowisko i metoda badania i oceny stopnia inaktywacji drobnoustrojów zawieszonych w powietrzu pod wpływem promieniowania UV-C**

Do badań przeżywalności drobnoustrojów w powietrzu po ich naświetleniu promieniowaniem UV-C stworzono stanowisko z wykorzystaniem opatentowanego przez CIOP-PIB zestawu do skojarzonego badania właściwości aerozoli włóknistych i biologicznych (Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej, patent nr 235437), którego główną częścią jest komora aerosolizacyjna umożliwiającą m.in. różne sposoby generacji bioaerozoli za pomocą HEPA-filtrowanego powietrza. Testom inaktywacji poddawane powinny być cząstki drobnoustrojów generowane do powietrza za pomocą nebulizatora Collisona (model MRE CN25, BGI Incorporated, Waltham, USA) w postaci monobioaerozoli z wodnych zawiesin. Stężenia zawiesin badanych drobnoustrojów powinny wynosić odpowiednio w przypadku: bakterii –  $\sim 6 \times 10^7$  jtk/cm<sup>3</sup>, grzyba *A. versicolor* –  $5,5 \times 10^5$  jtk/cm<sup>3</sup> i bakteriofaga PhiX174 –  $4,2 \times 10^5$  jtt/cm<sup>3</sup>, gdzie jtk to jednostki tworzące kolonie, a jtt to jednostki tworzące łyśinki. W komorze aerosolizacyjnej powinna następować homogenizacja wygenerowanych cząstek poprzez ich wymieszanie za pomocą mieszadła o zmiennej prędkości obrotowej śmigła. Prędkość mieszania aerozolu powinna być kontrolowana anemometrem (np. model Testo 435-4 z sondą IAQ, Testo Sp. z o.o., Pruszków). W badaniach wymuszona prędkość strugi powietrza w obrębie komory aerosolizacyjnej powinna wynosić 0,3m/s, co jest prędkością typową dla środowiska wewnątrz.

W komorze aerolizacyjnej kontrolowane i mierzone powinny być również parametry mikroklimatu tj. temperatura i wilgotność względna powietrza.

Metoda badania i oceny stopnia inaktywacji mikroorganizmów zawieszonych w powietrzu polega na tym, że przed rozpoczęciem pomiaru z każdym z badanych drobnoustrojów, komora aerolizacyjna powinna być czyszczona mechanicznie i chemicznie przy zastosowaniu alkoholowego środka do dezynfekcji powierzchni o bójczych właściwościach (np. Desprej, BOCHEMIE, s.r.o., Bohumín, Czechy). Każdy właściwy pomiar stężenia bioaerolu powinien być poprzedzony pomiarem sprawdzającym czystość komory aerolizacyjnej. W tym celu, na początku każdej sesji pomiarowej, zestaw badawczy powinien pracować przy braku materiału mikrobiologicznego w nebulizatorze (tj. generowany powinien być wyłącznie aerol wodny), a próbka powietrza powinna być pobierana w trzech odległościach (0,5m, 1m i 1,5m) od źródła promieniowania UV-C za pomocą np. pobornika guzikowego (Button Aerosol Sampler, SKC Inc., Eighty Four, USA) z filtrem poliwęglanowym o średnicy porów 1,2µm (np. Merck Millipore, Tullagreen, Irlandia) przy prędkości przepływu strugi 5l/min przez 5 minut w 2 powtórzeniach. Każdorazowo, laboratoryjne opracowanie pobranej w ten sposób próbki powietrza (patrz poniżej) powinno wykazywać brak wzrostu drobnoustrojów.

Właściwe pomiary stężenia drobnoustrojów powinien polegać na 20 minutowej nebulizacji badanego bioaerolu danego drobnoustroju do wnętrza komory aerolizacyjnej, w której w tej fazie badań powinien być umieszczony badany promiennik UV-C (światłólkowy bądź LED), który nie będzie włączony. W komorze bioaerol poddawany powinien być ciągłemu mieszaniu (przez strugę powietrza o prędkości 0,3m/s), a po tym okresie powinno nastąpić pobranie próbki kontrolnej bioaerolu za pomocą pobornika guzikowego z filtrem poliwęglanowym przy prędkości przepływu strugi 5l/min przez 5 minut w 2 powtórzeniach. Po wykonaniu pomiaru kontrolnego, w komorze aerolizacyjnej powinien zostać włączony badany promiennik UV-C (światłólkowy bądź LED), który przez kolejne 20 minut będzie napromieniowywał mieszany w komorze aerol danego drobnoustroju. Po tym okresie czasu należy wyłączyć badany promiennik i aspirować właściwe próbki bioaerolu w sposób opisany powyżej (tj. za pomocą pobornika guzikowego z filtrem poliwęglanowym) w trzech odległościach (0,5m, 1m i 1,5m) od źródła promieniowania UV-C.

Każdorazowo bezpośrednio po pobraniu bioaerolu każdego z badanych mikroorganizmów, każdy z filtrów powinien być umieszczany w probówce typu Falcon (np. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Niemcy) z 10ml roztworu ekstrahującego 0,9% soli fizjologicznej (np. Baxter Manufacturing Sp. z o.o., Lublin) z 0,05% dodatkiem Tween 80 (np. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy) i wytrząsany przez 1h w temperaturze pokojowej na wytrząsarce laboratoryjnej (np. model Promax 1020, Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Niemcy). Z uzyskanej zawiesiny drobnoustrojów należy wykonać szereg seryjnych rozcieńczeń (od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ ), a następnie wysiać (w 3 powtórzeniach) po 0,1ml badanej próbki na płytce Petriego z następującymi podłożami mikrobiologicznymi: TSA (bakterie), MEA (grzyby) i agarzem odżywczym z murawą *E. coli* (bakteriofag). Wszystkie płytki z posianymi zawiesinami drobnoustrojów należy inkubować w temperaturze pokojowej i po okresie inkubacji obliczyć stężenie (żywych i zdolnych do wzrostu na danym podłożu hodowlanym) mikroorganizmów bakteryjnych i grzybowych (w jednostkach tworzących kolonie,  $C_{jtk}$ ) oraz bakteriofaga (w jednostkach tworzących tysinki,  $C_{jti}$ ) w 1 litrze powietrza badanej próbki [ $jtk/l$ ,  $jti/l$ ] według wzoru:

$$C_{jtk/jti} = (N/10^{-D})(V_1/V_2)$$

gdzie:

$N$  – średnia liczba wyrosłych kolonii na podłożu [ $jtk$ ] lub tysinek na murawie [ $jti$ ],

$D$  – współczynnik rozcieńczenia,

$V_1$  – objętość roztworu ekstrahującego [ml],

$V_2$  – objętość posianej na agar próbki [ml].

Wszystkie opisane powyżej badania powinny być prowadzone w warunkach komory laminarnej zapewniającej bezpieczeństwo biologiczne na poziomie 2 (BSL-2).

#### **Kontrola stężenia ozonu w powietrzu**

Ponieważ promienniki oprócz bójczego promieniowania UV-C, emitują też promieniowanie o krótszej długości fali, które tworzy z tlenu zawartego w powietrzu ozon (podwyższone stężenie ozonu w powietrzu może prowadzić do reakcji zapalnych oczu czy chorób dróg oddechowych, w tym nasilenia objawów astmy oraz chorób układu krążenia), kontrola jego stężenia w czasie naświetlania próbek powinna być immanentną częścią badania promienników UV-C. Oznaczanie stężenia ozonu w powietrzu powinno być prowadzone w sposób ciągły z wykorzystaniem detektora jedno-gazowego np. Micro 5 G222E (Gesellschaft für Gerätebau mbH, Dortmund, Niemcy) wyposażonego w sensor elektrochemiczny  $O_3$  o zakresie pomiarowym 0–1ppm  $O_3$  (0–2mg/m<sup>3</sup>), granicy oznaczalności 0,01ppm (0,02mg/m<sup>3</sup>) i możliwości rejestrowania poziomu ozonu co 1 minutę.