

NILU: TR 5/2000

NILU: TR 5/2000
REFERANSE: E-99039
DATO: APRIL 2000
ISBN: 82-425-1166-7

Substrat for støvprøver beregnet for mikroskopering

Odd Anda

Innhold

	Side
Innhold	1
1 Innledning	2
2 Kvantitativ prøvetaking.....	2
3 Kvalitativ prøvetaking	3
4 Preparering av støvsubstrat for mikroskopering.....	3
4.1 Filtre	3
4.2 Tape.....	4
4.3 Glassplate (objektglass)	5
5 Referanser	7

Substrat for støvprøver beregnet for mikroskopering

1 Innledning

Målet med dette arbeidet har vært å komme frem til enkle metoder for prøvetaking av avsatt støv innendørs, og hvor støvpartiklene er deponert slik at de er egnet for partikkelstudier ved hjelp av lysmikroskop (identifisering og kvantifisering).

Rapportens innhold er basert dels på litteraturstudier, hovedsakelig The Particle Atlas (McCrone 1973) og dels egne laboratorieundersøkelser.

Det er i utgangspunktet ønskelig at de prøver man tar er:

- 3 Så enkle å utføre at alle kan gjøre det
- 3 Sendbare som post
- 3 Egnet for kvantifisering
- 3 Egnet for kvalitative undersøkelser i lysmikroskop
- 3 Egnet for standardisering og rutinemessig benyttelse
- 3 Sammenlignbare med eventuelt andre lignende anerkjente metoder
- 3 Rimelige i pris

2 Kvantitativ prøvetaking

En kvantitativ undersøkelse kan foregå på flere måter. Her ser man imidlertid bort fra metoder hvor partiklene ikke samles opp (eksempelvis optiske metoder).

Ved kvantitativ prøvetaking får man konsentrasjonen av partikler i luften som $\mu\text{g pr.m}^3$ eller som antall partikler pr.m^3 . Hvorvidt man bruker vekt eller antall avhenger vanligvis av hvordan grenseverdier og normer er gitt. Antall partikler er mest brukt for fibre. Partiklene kan i disse tilfellene foreligge på ulike typer filtre. Ved identifikasjon i mikroskop blir da oppgaven å gjøre filtrene egnet for en slik undersøkelse.

I noen tilfeller kan kvantifiseringen gå ut på å bestemme avsetningshastigheten, dvs vekt eller antall partikler $\text{pr. m}^2 \text{ pr. tidsenhet}$. Dette gjøres ved at filtre, glassplater eller andre materialtyper fungerer som substrat for partiklene. Substratene eksponeres fritt fra 1 til 14 døgn avhengig av antatt støvbelastning. Et problem kan da oppstå dersom prøven må sendes, da prøven ikke foreligger i noe lukket system. Måten å gjøre dette på er omtalt i kapittel 4.

Det kan også brukes vanlig klar tape eller geltape (spesielt laget for partikkelprøvetaking) til kvantifisering av avsetningshastighet. Bruken av disse er i praksis begrenset til telling, og det forutsettes at man kjenner når prøveoverflaten sist ble rengjort for støv.

3 Kvalitativ prøvetaking

Når formålet kun er å identifisere partiklene kan man i mange tilfeller benytte de samme prøvene som nevnt under forrige avsnitt, eller man kan preparere substrater som er enda bedre egnet for identifikasjon i mikroskop.

Løst støv som kan forsendes i en beholder eller en uforet papirkonvolutt (vanlig foretningskonvolutt) er å foretrekke. Dette forutsetter at det er så mye støv tilstede at det kan samles opp ved hjelp av en egnet liten kost eller ved å skrape støvflaten med en papplate (eksempelvis visittkort).

På steder hvor det er relativt lite støv kan man eksponere en glassplate (eksempelvis objektglass) i 14 døgn. En har da et egnet substrat for både kvantitativ (telling) og kvalitativ undersøkelse. Glassoverflaten bør tilsettes et klebrig stoff (se senere).

I tilfeller med svært lite støv er det mest praktisk å bruke tape eller geltape, som trykkes ned på overflaten som ønskes undersøkt.

4 Preparering av støvsubstrat for mikroskopering

De mest vanlige substrater for støvpartikler er ulike typer filtre og tape samt glassplater. For prøvetaking av sopp og bakterier brukes ulike typer agarløsninger. Sistnevnte prøvetakingsmetode er ikke tema i denne rapport.

Man bør unngå å bruke fiberfiltre, tørkepapir, servietter og liknende, samt tekstilkluter til tørking av støv beregnet for mikroskopering. I noen tilfeller kan man likevel få brukbare resultater ved å behandle slikt materiale i ultralydbad hvor prøven da legges eksempelvis i alkohol eller vann i et reagensglass. Men faren for sjenerende fragmenter fra substratet er stor, og det kan også være vanskelig å få ristet løs et representativt støvspekter.

4.1 Filtre

Identifikasjon av støvpartikler på filtre ved hjelp av mikroskop kan ofte være problematisk, da en har begrensede muligheter for å utnytte partiklenes optiske egenskaper. Hvite filtre vil også lett usynliggjøre fargeløse og svært lyse partikler.

En bør likevel alltid starte mikroskoperingen direkte på filteret, gjerne med lupemikroskop først. Man bør prøve både over- og underlys før man eventuelt begynner å overføre partikler på glassplate.

For å ta ut enkeltpartikler fra membranfiltre til undersøkelse på objektglass, brukes en nål dyppet i litt collodium (4% cellulosenitrat i alkohol og eter). Man bør være noe rask, da collodium tørker etter i underkant av et minutt.

For papirfilter vil det være bedre med gummilim, da collodium fukter papir.

For å usynliggjøre filtrene plassert på glassplate kan de dyppes i brytningsindeksvæsker med verdiene 1,54 for papir-, 1,52 for glassfiber- og 1,51-1,52 for membranfiltre (av eksempelvis type Millipore). Et velegnet medium for

membranfiltere er Merck immersjonolje for mikroskopi (4699) som har brytningsindeks rundt 1,516.

For membranfiltre kan man også anvende glyseroltriacetat tilsatt noe sprit. Bruker man ren glyseroltriacetat må preparatet varmes svakt for å få filteret helt fargeløst. Ved forsiktighet og eksponert side vendt ned mot glasset kan man fortsette oppvarmingen over spritflammen. Temperaturen på overflaten av glasset vil nå ca. 500 °C, og dette er tilstrekkelig til å fjerne det organiske materialet, slik at bare uorganiske partikler (for det meste aske, mineralfibrer og mineraler) blir igjen på objektglasset. (Obs: Glasset kan sprekke under denne operasjonen; men vanligvis går dette bra når prøven (preparatet) er plassert i den ene kant eller hjørne av glasset).

Membranfiltre kan løses i aceton i sentrifugeglass. Ved sentrifugering samles partiklene raskt i bunnen. Etter sentrifugering pipetteres eller dekanteres overliggende væske av. Det tilsettes nytt løsningsmiddel, deretter ultralyd-behandling og sentrifugering. Dette gjentas etter behov. Etter siste dekantering og ultralyd-behandling legges 1-2 dråper på objektglass. Etter avdamping er preparatet klar for mikroskopering.

Nuclepore filter er en fargeløs polykarbonat film gjennomsluttet av uniforme hull, og alle partikler vil ligge i tilnærmet samme plan. Partiklene kan undersøkes med ulike brytningsindeksvæsker direkte på filteret. De kan også lett fjernes enkeltvis. Dersom det er store mengder partikler kan de skrapes av, eventuelt fjernes med ultralyd.

En ulempe med bruk av membran- og nuclepore filtre er at de meget lett blir elektrostatisk ladet.

Filtre generelt er best egnet til konsentrasjonsmålinger. I forbindelse med forsendelser vil de da være innesluttet i filterholdere.

4.2 Tape

En meget benyttet metode for å vurdere støvmengder i renholdssammenheng er utviklet av STAMI og firmaet Bygge- og Miljøteknikk i København i samarbeid med rengjøringsbransjen i Norge, Sverige og Danmark (Schneider et al., 1994).

Metoden baserer seg på prøvetaking med geltape. Ved å måle lysgjennomgangen (laser-stråler) i en BM-Dustdetector før og etter prøvetaking med tape, beregner detektoren støvavsetningen som vises direkte på instrumentet i prosent støvdekke.

Partikler på geltape er vanskelig å undersøke kvalitativt, da partiklene gjerne ligger mer eller mindre dekket av seigt limstoff.

Vi har testet en geltape fra Holland (BVDA-folie)¹. Man kan fjerne partikler fra denne enten ved å ultralyd-behandle geltapen neddyppet i sprit, eller ved å trekke

¹ Leverandøren av denne geltape er BVDA International BV P.O.Box 5064, 1007 AB Amsterdam, Holland. Tapen distribueres også av: Petersen-Bach ltd. Enebaervej 7, DK-8850 Bjerringbro, Danmark. (Tlf.: 45 86 68 46 00, Telefax: 45 86 68 47 37).

partiklene av geltapen med vanlig fargeløs tape. Dette siste er mulig fordi tapen er betydelig mer klebrig enn geltapen (behandling av tape, se nedenfor).

Tape kan som tidligere nevnt under visse forutsetninger brukes kvantitativt til prøvetaking (telling).

Kvalitativt kan tape brukes som en screening metode, eller dersom resultatet behøves raskt eller det er lite støv i det aktuelle området. Oppkostings- eller skrapeprøver vil imidlertid være det klart beste alternativet.

Ved transport eller forsendelse av tapeprøve festes tapen til et rent objektglass med limsiden ned.

På laboratoriet bør man foreta en mikroskopiundersøkelse før man tar tapen av glassplaten. Man kan fortrinnsvis bruke lupemikroskop (stereobinokulær-mikroskop) med reflektert lys, eller om man ønsker mer forstørrelse bruke universalmikroskop med gjennomfallende lys. Prøven plasseres da slik at glassplaten vender opp. Det vil bedre bildekvaliteten dersom en dråpe immersjonsvæske med brytningsindeks på ca. 1,50 plasseres mellom tapen og glassplaten. Brytningsindeks for partikler kan da vurderes i forhold til 1,50.

Partiklene kan fjernes fra tapen ved tilførsel av benzene mellom glass og tape. Tapen kan da dras av. Limet med partiklene blir da liggende igjen på glassplaten (objektglasset). Med litt øvelse går denne siste operasjonen greit. Et dekkglass kan nå legges på limet som inneholder partiklene.

Limet på tapen kan fjernes med benzene, xylene, amyloacetat eller karbontetraklorid ("tetra"). Tapen (med lim og partikler) legges i en sentrifugebeholder fylt med en av de ovennevnte løsemidler, og partiklene løses i ultralydbad. Platen fjernes, og partiklene med limet sentrifugeres. Løsemidlet over partiklene fjernes (dekanteres). Så følger ny tilsetning av løsningsmiddel, ultralydbehandling og sentrifugering. Sentrifugeringstiden er selvsagt avhengig av sentrifugens omdreiningshastighet. Her må man prøve seg noe frem med det utstyret man har (med >1 000 omdreininger pr. minutt vil det holde med noen få minutters sentrifugering). Operasjonen gjentas etter behov. Etter siste dekantering og ultralydbehandling dryppes en eller to dråper av partikkelsuspensjonen på objektglass, og etter avdamping av løsemiddel er prøven klar for mikroskopering.

En må være oppmerksom på at bruk av organiske løsemidler kan føre til tap av løselige særlig organiske partikler. Det er derfor viktig å ha undersøkt støvprøven så godt det lar seg gjøre før behandlingen med løsemidler.

4.3 Glassplate (objektglass)

Glassplate (eksempelvis objektglass) kan brukes ved både kvantitativ og kvalitativ støvprøvetaking. Ved kvantitativ prøvetaking må man kjenne eksponeringstiden. Avsatte partikler kan så telles, og man får et mål for avsatt partikkelantall pr m² pr. tidsenhet (døgn). Slike prøver kan også anvendes for identifikasjon av partikler.

Ved veiing av glasset før og etter eksponering kan man også få vekt pr. tidsenhet og areal.

Ved eksponering bør glassplaten plasseres i en beholder, eksempelvis petriskål, slik at den er noe beskyttet mot berøring og luftturbulens. Passende vegghøyde på beholderen er 3 – 5 cm.

Ofte vil det være slik at støvprøven må sendes fra prøvetakingstedet. For ikke å miste partikler under transporten må glassplaten overflatebehandles slik at den blir noe klebrig; men samtidig egnet for mikroskopering.

Den klebrige filmen kan lages på følgende måte:

1. Bland en løsning bestående av 100 deler etanol, 4 deler collodium og 2 deler glyserol.
2. I denne løsning dyppes glassplaten (objektglasset). Dersom man ikke vil ha film på begge sider av glasset maskeres ene side med en vanlig tape. Det er ikke nødvendig å forbehandle glasset; men det må naturligvis være fritt for partikler.
3. Sett glasset på høykant til tork ved romtemperatur i et støvfritt miljø. Maskeringstapen kan fjernes etter noen minutter, og etter noen timer kan glassene settes i en dertil egnet oppbevaringsboks.

En film som lages på denne måten vil være svært tynn og jevnt fordelt over hele glassflaten. Den vil dessuten være svakt fuktig, men tilstrekkelig klebrig til at partiklene sitter fast i filmen. Filmen sjenerer ikke vesentlig ved bruk av brytningsindekssvæsker direkte på glasset.

Det er viktig å kontrollere at ueksponert overflate er rimelig fri for partikler etter pålegging av klebrig film.

Forsendelse av glassplaten kan skje i en i rund plastbeholder med indre diameter omtrent som bredden på glassplaten. Det finnes også spesielle beholdere på markedet hvor det er plass til flere objektglass.

Noe friere i valg av emballasje står man dersom glassplaten i den ene endekant på filmsiden pålimes en liten dobbelsidig tapepute. Puten festes der man holder glasset med fingrene når det dyppes i filmløsningen (dette mangler film). Over puten legges så en ny ren glassplate av samme størrelse. I den andre endekant holdes de to platene sammen ved hjelp av en liten tapebit.

Partiklene vil nå være beskyttet, og prøven kan tåle en forsendelse i en pakke av ikke for bløtt materiale. Prøven kan merkes på beskyttelsesglasset.

5 Referanser

Mc Crone, W. C. and Delly, J. G. (1973) *The Particle Atlas*. 2nd ed. Volume 1: Principles and techniques. Ann Arbor, Michigan, Ann Arbor Science.

Schneider, T., Løbner, T., Nilsen, S.K. and Petersen, O.H. (1994) Quality of cleaning quantified. *Building and Environment*, 29 (3), 363-367.



Norsk institutt for luftforskning (NILU)

Postboks 100, N-2027 Kjeller

RAPPORTTYPE TEKNISK RAPPORT	RAPPORT NR. TR 5/2000	ISBN 82-425-1166-7 ISSN 0807-7185	
DATO	ANSV. SIGN.	ANT. SIDER 7	PRIS NOK 15,-
TITTEL Substrat for støvprøver beregnet for mikroskopering		PROSJEKTLEDER Odd Anda	
		NILU PROSJEKT NR. E-99039	
FORFATTER(E) Odd Anda		TILGJENGELIGHET * A	
		OPPDRAKSGIVERS REF.	
OPPDRAKSGIVER NILU			
STIKKORD Støvprøvetaking	Mikroskopering		
REFERAT Rapporten beskriver hvordan man kan lage underlagsmateriale (substrat) for prøvetaking av avsatt støv, i hovedsak beregnet for innemiljø. Hovedmålet var å komme fram til underlag som var egnet for partikkelidentifikasjon ved hjelp av lysmikroskopering. Metoden er beskrevet for bruk av filtere, tape og glass som underlagsmateriale.			
TITLE Preparation of substrates for particle sampling and for identification purposes by microscopy.			
ABSTRACT			

* Kategorier: A Åpen - kan bestilles fra NILU
 B Begrenset distribusjon
 C Kan ikke utleveres