



**KATEDRA
TECHNICKÝCH
ZAŘÍZENÍ BUDOV**

Rozšíření výuky v laboratořích TZB o mikrobiální hodnocení kvality vnitřního vzduchu

Řešitel:

Ing. Hana Kabrhelová, Ph.D., Hana.kabrhelova@fsv.cvut.cz

Katedra Technických zařízení budov

Projekt:

Finanční podpora inovačních projektů akademických pracovníků ČVUT
zaměřených na podporu výuky a vzdělávání pro rok 2024

Výstupy projektu:

Typ výstupu	počet
Podklady pro přednášky / semináře / cvičení v CZ/EN (včetně elektronických)	2
Elektronická učebnice / skripta / studijní materiály / dokumentace pro podporu výuky v CZ/EN	1
Vzdělávací / inovativní opory pro zefektivnění a inovaci různých forem výuky (audio/video nahrávky, VR/AR apod.) v CZ/EN	1

Podklady pro přednášky / semináře / cvičení v CZ/EN (včetně elektronických):

Laboratorní cvičení č. 1 – kvantitativní hodnocení mikrobiální kvality
vnitřního vzduchu, odběr a kultivace vzorků

Laboratorní cvičení č. 1 – kvantitativní hodnocení mikrobiální kvality vnitřního vzduchu, odběr a kultivace vzorků

Název: **Odběr a kultivace mikrobiálních vzorků**

Cvičení slouží pro stanovení mikrobiální kontaminace vzduchu a povrchů, podrobněji bude zkoumáno znečištění bakteriemi a plísněmi. Studenti se nejprve se seznámí s metodami odběru mikrobiologických vzorků, následně si odeberou vzorky z ovzduší a povrchů zkoumaného prostoru a nakonec připraví vzorky pro kultivaci. V následném cvičení budou seznámeni a vyzkouší si kvantitativní hodnocení odebraných vzorků.

Potřebné vybavení:

- Aeroskop s impaktorem
- Stěrové tyčinky s fyziologickým roztokem
- Petriho misky s živnou půdou
 - TSA agar (trypton sojový agar pro zkoumání kontaminace vzduchu bakteriemi)
 - Sabouradova půda (pro zkoumání kontaminace vzduchu plísněmi)
- Inkubátory
- Počítadlo kolonií
- Autokláv
- Desinfekce – denaturovaný líh v rozprašovači a savo
- Ochranné pomůcky (laboratorní plášť a jednorázové rukavice)

Teoretická část:

Metody odběrů mikrobiologických vzorků

Metody odběrů mikrobiologických vzorků lze dělit dle několika různých kritérií, tím základním je určení, zda-li bude odběr vzorků tzv. kvalitativní, či kvantitativní.

Kvalitativní hodnocení znamená kvalitativní analýzu zabývající se průkazem přítomnosti určité cílové skupiny mikroorganismů.

Kvalitativním hodnocením vzorku rozumíme stanovení počtu životaschopných mikroorganismů v daném vzorku.

Dalším možným rozdělením je způsob odběru vzorků:

Pasivní monitoring, pasivní odběr vzorků, nebo-li metoda spadů, je odběr vzorků prováděný pomocí sedimentačních Petriho misek (obr. č. 1 a 2).

Tyto misky s živným médiem (nejčastěji TSA agar (Tryptic Soy Agar) nebo Sabouradova půdou) jsou umístěny ve sledovaném prostoru. Umístění je provedeno tak, aby s nimi nebylo manipulováno v rámci běžného provozu a aby nedošlo ke kontaminaci uživateli prostoru. Po určitém času (pro účely výuky 10-30 min) vystavení vzduchu jsou Petriho misky uzavřeny a dopraveny do laboratoře. Metoda je vhodná pro kvantitativní mikrobiologické hodnocení, je tedy vhodná pro dlouhodobý monitoring specifických provozů (čisté prostory, potravinářské zpracovatelské závody apod., prostory s pobytem imunodeficientních osob apod.)



Obr. č. 1 – Petriho misky s TSA agarem



Obr. č. 2 – Petriho misky se Sabouradovou půdou

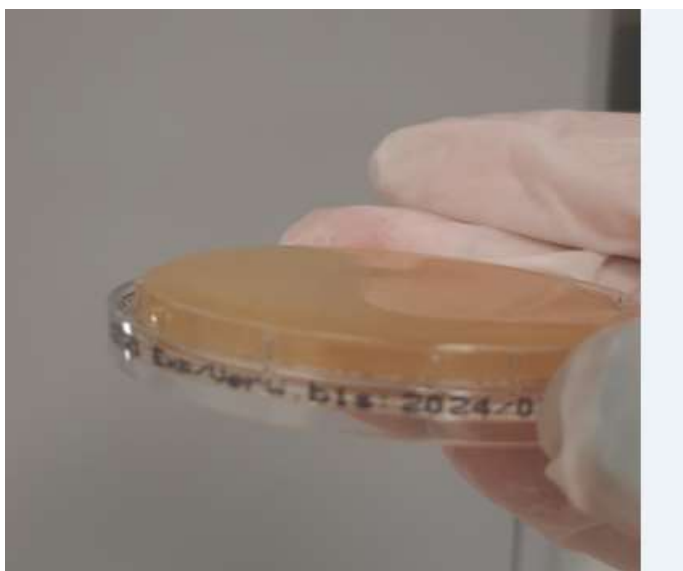
Aktivní odběr vzorků je přímý fyzický zásah do zkoumaného prostoru – tedy odběr stěrů z povrchů, či odběr vzduchu specializovaným nástrojem – aeroskopem.

- Odběr pomocí stěrů ploch slouží k zachycení mikrobiomu nacházejícího se pouze na povrchu daného analyzovaného prvku. Pro prokázání mikroorganismů je vhodné využít co největší možnou plochu ke stěru, tedy ($0,1 \text{ m}^2 - 0,3 \text{ m}^2$), pro účely cvičení pro stanovení počtu mikroorganismů postačí plocha $0,01 \text{ m}^2$ (tj. $10\text{cm} \times 10\text{cm}$).
 - Stěr se standardně provádí **pomocí sterilních nástrojů** (sterilní stěrka, stěrové tampony, nebo houbičkou, obr. č. 3). Tímto nástrojem se stírá vyznačený prostor stěry vedenými přes celou plochu a vedenými kolmo na sebe a nanese se na živnou půdu.



Obr. č. 3 – Stěrové tampony a houbičky

- Další možností je provádění stěru **pomocí stěrové Petriho misky** s agarovým živným médiem.

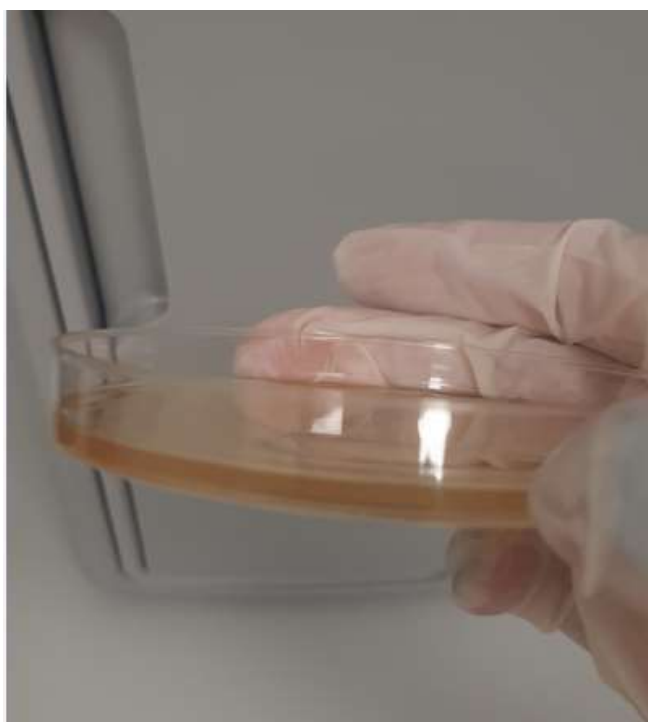


Obr. č. 4 – Petriho miska pro otisk

- Odběr biologických vzorků z proudícího média je prováděn s pomocí sterilních specializovaných nástrojů – aeroskop s impaktorem (obr. č. 5). Je třeba odebrat přesně stanovené množství vzduchu. Impaktor je zařízení na odběr mikrobiologických vzorků z proudícího vzduchu, kdy je vzduch podtlakově vháněn do přístroje pomocí ventilátoru, kde jsou mikroorganismy usazovány na Petriho misce s agarem (obr. č. 6).



Obr. č. 5 – Aeroskop pro aktivní monitoring vzduchu



Obr. č. 6 – Petriho miska pro vložení do aeroskopu

Po provedení odběrů vzorků je nutno použité nástroje s odebranými vzorky umístit do sterilního prostředí, zamezit přístupu kontaminantů, vody, přímého slunečního světla a vystavení extrémním teplotám. Takto připravené vzorky musí být do 24 hodin být vloženy do inkubátoru (obr. č. 7), kde se mikroorganismy budou kultivovat. Vzorky mohou být uloženy i do chladničky (Petriho misky uzavřít parafilmem) po omezenou dobu a inkubaci provést později.

Kvantitativní hodnocení odebraných vzorků

Pro kvantitativní hodnocení je potřeba mikroorganismy na odebraných médiích kultivovat. Kultivace probíhá v inkubátoru (někdy též zvaném termostatu) při nastavené teplotě potřebné pro kultivaci po přesně stanovenou dobu podle toho, zda se hodnotí plísně či bakterie. Pro kultivaci máme dvě možnosti dle volného místa v inkubátorech:

- Varianta A - volný jen jeden inkubátor: Pro výukové účely budou jako první kultivovány misky s TSA agarem s bakteriemi. Misky se Sabouradovou půdou (dále jen SP) budou po dobu kultivace bakterií umístěné v chladničce a uzavřené parafilmem. Poté budou kultivovány.
- Varianta B - volné oba inkubátory: Misky s TSA agarem budou kultivovány v jenom inkubátoru a misky se sabouradovou půdou v druhém



Obr. č. 7 – Inkubátor pro kultivaci plísní

Obr. č. 8 – Inkubátor pro kultivaci bakterií



Obr. č. 8 – Inkubátor pro kultivaci bakterií

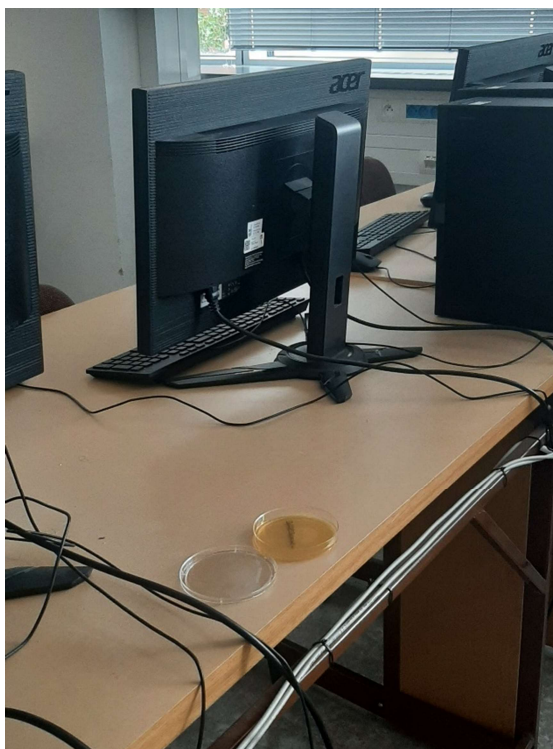
Experimentální část:

1. Rozdělení studentů do týmu po 4.
2. Příprava Petriho misek a důkladné označení (obr. č. 9) podle typu půdy, místa a způsobu odběru:
 - Petriho misky pro spad (TSA, SP)
 - Petriho misky pro nasávání impaktorem (TSA, SP)
 - Petriho misky pro stěr (TSA, SP)



Obr. č. 9 – Označené Petriho misky

3. Umístění Petriho misek (obr. č. 10) pro spad po stanovenou dobu (10 -30 min)



Obr. č. 10 – Umístěná Petriho miska

- 4. Odběr biologických vzorků z proudícího vzduchu přes impaktor aeroskopem (obr. č. 11) viz. kapitola postup práce s aeroskopem**



Obr. č. 11 – Nasávání vzduchu aeroskopem

- 5. Stěr určených povrchů o zadané ploše (bude zadáno vyučujícím v průběhu cvičení)**
- 6. Sterilizace impaktoru aeroskopu – umístit do sterilizačního sáčku a uzavřít, vložit do autoklávu (15 minut při 121°C) (obr. č. 12 a 13)**



Obr. č. 12 – Autokláv



Obr. č. 13 – Impaktor umístěný ve sterilizačním sáčku pro sterilizaci v autoklávu

- 7. Petriho misky s TSA agarem umístit do inkubátoru na 48 hodin s teplotou $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$**



Obr. 14 – Petriho misky v inkubátoru

- 8. A) Petriho misky s SP uzavřít parafilmem a umístit do chladničky a inkubovat po dokončení inkubace misek s TSA agarem. SP inkubovat při teplotě $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 dní**
B) Petriho misky s SP umístit do inkubátoru a inkubovat při teplotě $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 dní



Obr. 15 – Ovládání inkubátoru

Postup práce s aeroskopem

Pomocí aeroskopu s impaktorem odebrat vzorky na dvě Petriho misky s agarem – jedna pro růst bakterií a druhá pro růst plísní. Průtok a množství vzduchu nutno nastavit dle předpokládaného znečištění vnitřního vzduchu (25 l/min, 50 l/min či 100 l/min).

Stanovení koncentrace bakterií a plísní v ovzduší vnitřního prostředí se provádí ve vnitřním prostředí po 20 minutách důkladného vyvětrání a po další jedné hodině uzavření oken. V případě prostorů s klimatizací bez možnosti větrání jsou nutné odběry v prostředí bez provozu, nejdříve za 20 minut od ukončení činnosti.

Ve středu místnosti v inhalační zóně ve výšce 160 cm nad zemí se provedou dva odběry ovzduší. Doba mezi jednotlivými odběry je minimálně 10. maximálně 30 minut. Pro odběry je možno zvolit i jiné místo (umístění přístroje, nadzemní výška) podle účelu vyšetření. Tuto skutečnost je nutné zaznamenat do protokolu o měření.

Mezi jednotlivými odběry je odběrová horní část přístroje očištěna ubrouskem napuštěným dezinfekčním přípravkem. Mezi odběry vzduchu v odlišných interiérech je odběrová hlava přístroje sterilizována autoklávováním (15 minut při 121°C).