



**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. 2 – kvantitativní hodnocení mikrobiální kvality
vnitřního vzduchu, vyhodnocení

Laboratorní cvičení č. 2 – kvantitativní hodnocení mikrobiální kvality vnitřního vzduchu, vyhodnocení

Název: **Kvantitativní hodnocení odebraných vzorků**

Cvičení slouží pro základní stanovení počtu kolonií KTJ (kolonie tvořící jednotky) vzduchu a povrchů, podrobněji bude zkoumáno znečištění bakteriemi a plísněmi. Studenti využijí nakultivované Petriho misky z předešlého cvičení. Nejprve se seznámí s metodami počítání kolonií, následně si práci vyzkouší na svých odebraných a nakultivovaných vzorcích.

Potřebné vybavení a pomůcky:

- Ochranné pomůcky (laboratorní plášť a jednorázové rukavice)
- Inkubátor
- Petriho misky s koloniemi (vzorky získané nasáváním vzduchu, vzorky ze spadu a stěru)
- Manuální počítadlo kolonií (obr. č. 1)
- Značkovací pero pro označení spočítaných kolonií
- Informace o objemu nasátého vzduchu (např. litrech, v metrech krychlových, l, m³)
- Zapisovací arch a protokoly z měření
- Autokláv
- Desinfekce – denaturovaný líh v rozprašovači a Savo



Obr. č. 1 – Manuální počítadlo kolonií

Teoretická část:

Pro kvantitativní hodnocení je potřeba mít mikroorganismy na odebraných médiích nakultivované v inkubátoru při nastavené teplotě potřebné pro kultivaci po přesně stanovenou dobu podle toho, zda se hodnotí plísně či bakterie.

Ke kvantitativnímu hodnocení slouží speciální přístroj - počítadlo kolonií. Počítadlo může být automatické nebo manuální. Pro účely výuky je použito manuální čítačka kolonií.

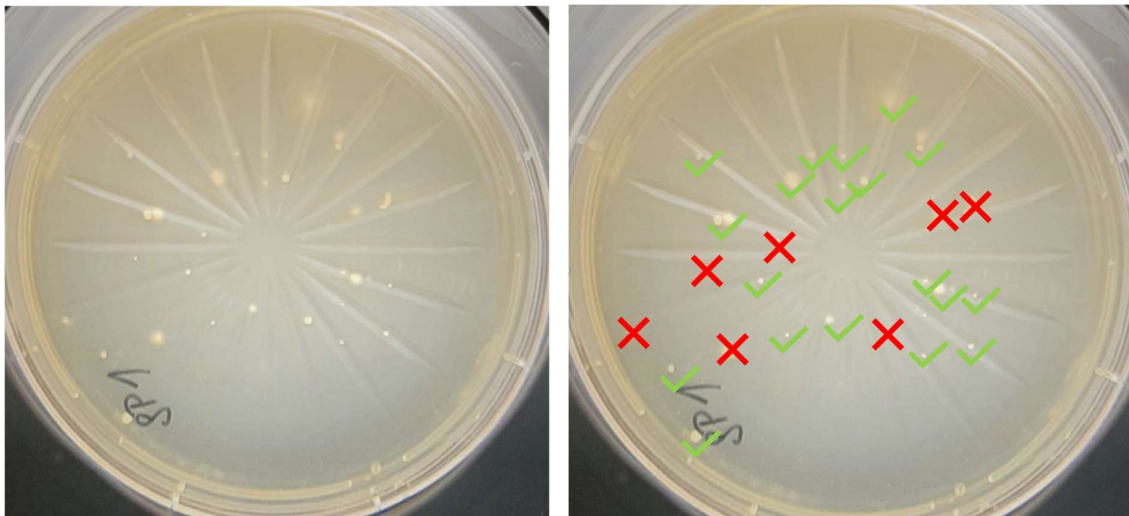
Petriho misky s namnoženými koloniemi z aktivního nasávání vzduchu aeroskopem, je nutno vyhodnotit odděleně a rozlišit pozitivní nález a falešně pozitivní nález. Impaktor aeroskopu má speciální „hvězdicí“ (obr. č. 2), přes kterou se vzduch nasává na petriho misku. Tudíž kolonie narostlé v místě této „hvězdice“ jsou pozitivním nálezem. **Kolonie narostlé mimo tuto „hvězdici“ jsou falešně pozitivním nálezem a do hodnocení se nezapočítávají.** Příklad pozitivních a falešně pozitivních výsledku je znázorněn na obr. č. 4.



Obr. č. 2 – Impaktor aeroskopu s viditelnou „hvězdicí“



Obr. č. 3 – „Hvězdice“ na petriho misce



Obr. č. 4 – Příklad petrihy misky s koloniemi (vlevo) a petrihy misky s označenými pozitivními a falešně pozitivními výsledky (vpravo)

Na Petriho se miskách se spočítá počet kolonií KTJ (kolonie tvořící jednotky) jak pro bakterie, tak pro plísně. Následně dojde k vyhodnocení počtu KTJ na miskách. Zejména dojde k porovnání počtu kolonií mezi pasivním sběrem a aktivním sběrem aeroskopem. Z Petriho misek odebraných aeroskopem se na základě množství použitého vzduchu při odběru stanoví KTJ/m³ vzduchu.

V současné době máme podle Vyhlášky č. 6/2003 Sb., kterou se stanoví hygienické limity chemických, fyzikálních a biologických ukazatelů pro vnitřní prostředí pobytových místností některých staveb, nastaveny požadavky, kdy limit je splněn, nepřekročí-li koncentrace mikroorganismů 500 a plísni 500 kolonií tvořících jednotek na 1 m³ vzduchu aktivním nasáváním vzduchu za pomoci aeroskopu (KTJ/m³).

Zjednodušený postup:

- 1) Vyjmutí Petriho misek z inkubátoru (v rukavicích)
- 2) Umístění Petriho misek jednotlivě na určené místo v manuálním čítači kolonií
- 3) Manuální odečet počtu kolonií – značkovacím perem si označit každou kolonii, při dotyku Petriho misky čítadlo automaticky započítá kolonii, potvrdí i zvukovým signálem a zobrazí se na displeji, misky s nakultivovanými koloniemi zásadně neotevírat! (obr. č. 5)
- 4) Postupně výpočet KTJ na všech Petriho miskách
- 5) Zapsat do archu počty KTJ pro plísně a bakterie pro jednotlivé odběry
- 6) Porovnat množství KTJ mezi pasivním sběrem a aktivním sběrem aeroskopem
- 7) Popsat barvu, tvar, odhadnout kolik různých druhů mikroorganismů narostlo
- 8) Sterilizace použitých Petriho misek v autoklávu (při 134°C)

- 9) Desinfekce počítadla kolonií a všech povrchů v pracovním místě
10) Likvidace Petriho misek s použitím desinfekce



Obr. č. 5 – Petriho miska umístěná v počítadle kolonií

Experimentální část:

Laboratorní postup: Výpočet počtu kolonií na Petriho miskách

1. Příprava pracovního prostoru:

- Uspořádání Petriho misek vyjmutých z inkubátorů a kontrola jejich označení.
- Rozdělení Petriho misek do tří skupin: na vzorky z aktivního odběru, pasivního odběru a sčtu

2. Vizualizace kolonií:

- Umístěte Petriho misku pod lupu manuální čítačky kolonií
- Nastavte si intenzitu podsvícení
- Zhodnotit počet typů kolonií z hlediska tvaru, barvy a velikosti

3. Počítání kolonií:

- **Kolonie spočítejte manuálně** pomocí čítačky kolonií. Každou kolonii počítejte jedním kliknutím čítačky.
- Pro snadnější kontrolu označte již spočítané kolonie na spodní straně Petriho misky pomocí **markeru**.

4. Zaznamenání výsledků:

- Po spočítání všech kolonií na Petriho misce zaznamenejte celkový počet kolonií do zapisovacího archu a protokolu o měření

5. Výpočet počtu kolonií ve vzduchu KTJ/m³ (CFU/m³):

- Pro výpočet **koncentrace mikroorganismů ve vzduchu** použijte následující vzorec:

$$\text{CFU/m}^3 = \frac{\text{Počet kolonií (CFU)}}{\text{Objem nasátého vzduchu (m}^3\text{)}}$$

Kde:

- **Počet kolonií (CFU)** = počet spočítaných kolonií na Petriho misce.
- **Objem nasátého vzduchu (m³)** = objem vzduchu, který byl nasáván a kultivován na Petriho misce (např. 0,5 m³, 1 m³ apod.).

Příklad: Pokud jste nasáli 1 m³ vzduchu a na Petriho misce narostlo 100 kolonií:

$$\text{CFU/m}^3 = \frac{100}{1} = 100 \text{ CFU/m}^3$$

Tento výsledek znamená, že ve vzduchu bylo 100 kolonií na metr krychlový vzduchu.

6. Opakování postupu u dalších vzorků:

- Pokud máte více Petriho misek s různými objemy nasátého vzduchu, zopakujte výpočet pro každý vzorek zvlášť.

7. Závěr:

- Zkontrolujte, zda všechny výsledky byly správně zapsány a výpočty provedeny pro všechny misky.

Poznámky:

- **CFU/m³ (kolonie tvořící jednotky na metr krychlový vzduchu)** je standardní jednotkou pro vyjádření koncentrace mikroorganismů v nasávaném vzduchu.
- Pokud byl nasán příliš malý objem vzduchu a na misce narostlo málo kolonií, výsledky mohou být nepřesné – v takovém případě je vhodné nasát větší objem vzduchu.
- Pokud je počet kolonií příliš vysoký a není možné je přesně spočítat, může být potřeba odebrat menší množství vzduchu.

Protokol z měření viz. Příloha č. 1 a 2

Příloha č. 1 - Protokol z hodnocení mikrobiální kvality vnitřního vzduchu

Datum měření: [doplnit]

Místo měření: [doplnit]

Použité zařízení: Aeroskop [typ zařízení, např. BioCapt® Single-Use]

Objem vzduchu: [doplnit] počet litrů na každý odběr

Celkový počet odběrů: [doplnit] odběry ([doplnit] na TSA, [doplnit] na Sabouradovu půdu)

Limit KTJ (kolonie tvořící jednotky): 500 KTJ/m³

Popis měření

Měření bylo provedeno v uzavřené místnosti o velikosti přibližně [doplnit] m² s [doplnit] způsob větrání, počet osob apod.]. Za účelem stanovení mikrobiální čistoty ovzduší byly použity dvě různé kultivační půdy: Trypticase Soy Agar (TSA) a Sabouradova glukózová půda.

Parametry a postup měření:

Aktivní odběr aeroskopem:

1. Odběr č. 1a:

- **Použitá půda:** TSA
- **Místo odběru:** [doplnit]
- **Objem vzduchu:** [doplnit]
- **Výsledek:** [doplnit počet KTJ/m³]

2. Odběr č. 1b:

- **Použitá půda:** Sabouradova půda
- **Místo odběru:** [doplnit]
- **Objem vzduchu:** [doplnit]
- **Výsledek:** [doplnit počet KTJ/m³]

3. Odběr č. 2a:

- **Použitá půda:** TSA
- **Místo odběru:** [doplnit]
- **Objem vzduchu:** [doplnit]
- **Výsledek:** [doplnit počet KTJ/m³]

4. Odběr č. 2b:

- **Použitá půda:** Sabouradova půda
- **Místo odběru:** [doplnit]
- **Objem vzduchu:** [doplnit]
- **Výsledek:** [doplnit počet KTJ/m³]

[doplnit popis dalších odběrů]

Pasivní odběr:

1. **Odběr č. 3a:**
 - **Použitá půda:** TSA
 - **Místo odběru:** [doplnit]
 - **Výsledek:** [doplnit počet KTJ/misku]
2. **Odběr č. 3b:**
 - **Použitá půda:** Sabouradova půda
 - **Místo odběru:** [doplnit]
 - **Výsledek:** [doplnit počet KTJ/misku]
3. **Odběr č. 4a:**
 - **Použitá půda:** TSA
 - **Místo odběru:** [doplnit]
 - **Výsledek:** [doplnit počet KTJ/misku]
4. **Odběr č. 4b:**
 - **Použitá půda:** Sabouradova půda
 - **Místo odběru:** [doplnit]
 - **Výsledek:** [doplnit počet KTJ/misku]

[doplnit popis dalších odběrů]

Vyhodnocení výsledků:

Limitem pro mikrobiální kontaminaci vzduchu je 500 KTJ/m³. V případě překročení tohoto limitu je nutné provést další šetření a přijmout opatření k odstranění zdroje kontaminace.

- **Odběr č. 1a (TSA):** [doplnit výsledek KTJ/m³ a zda je nad/pod limitem]
- **Odběr č. 1b (Sabouradova půda):** [doplnit výsledek KTJ/m³ a zda je nad/pod limitem]
- **Odběr č. 2a (TSA):** [doplnit výsledek KTJ/m³ a zda je nad/pod limitem]
- **Odběr č. 2b (Sabouradova půda):** [doplnit výsledek KTJ/m³ a zda je nad/pod limitem]

- **Odběr č. 3a (TSA):** [doplnit výsledek KTJ/misku]
- **Odběr č. 3b (Sabouradova půda):** [doplnit výsledek KTJ/misku]

A porovnat s aktivním odběrem, zda je množství KTJ vyšší/nížší

- **Odběr č. 4a (TSA):** [doplnit výsledek KTJ/misku]
- **Odběr č. 4b (Sabouradova půda):** [doplnit výsledek KTJ/misku]
- A porovnat s aktivním odběrem, zda je množství KTJ vyšší/nížší

[doplnit popis dalších odběrů]

Závěr:

Na základě výsledků odběrů [závěrečné hodnocení, např. "výsledky měření jsou v normě a nejsou nutná žádná další opatření" nebo "došlo k překročení limitu, je třeba provést nápravná opatření"]. Zhodnocení a diskuse nad výsledky aktivního a pasivního odběru.

Podpis osoby provádějící měření:

[doplnit jména]

Příloha č. 2 - Protokol z hodnocení mikrobiální kvality povrchů

Datum měření: [doplnit]

Místo měření: [doplnit]

Celkový počet odběrů: [doplnit] odběry ([doplnit] na TSA, [doplnit] na Sabouradovu půdu)

Popis měření

Měření bylo provedeno, stěry byly odebrány z míst Za účelem stanovení mikrobiální čistoty byly použity dvě různé kultivační půdy: Trypticase Soy Agar (TSA) a Sabouradova glukózová půda.

Parametry a postup měření:

1. Odběr č. 1a:

- a. **Použitá půda:** TSA
- b. **Místo odběru:** [doplnit]
- c. **Výsledek:** [doplnit počet KTJ]

2. Odběr č. 1b:

- a. **Použitá půda:** Sabouradova půda
- b. **Místo odběru:** [doplnit]
- c. **Výsledek:** [doplnit počet KTJ]

[doplnit popis dalších odběrů]

3. Odběr č. 2a:

- a. **Použitá půda:** TSA
- b. **Místo odběru:** [doplnit]
- c. **Výsledek:** [doplnit počet KTJ]

4. Odběr č. 2b:

- a. **Použitá půda:** Sabouradova půda
- b. **Místo odběru:** [doplnit]
- c. **Výsledek:** [doplnit počet KTJ]

[doplnit popis dalších odběrů]

Vyhodnocení výsledků:

Naměřené hodnoty nelze porovnat s vyhláškou č. 6/2003 Sb., jelikož se jedná o stěry a získané hodnoty jsou počty plísní či KTJ (kolonií tvořících jednotek) na stěr, tedy získané údaje jsou o mikroorganismech žijících na povrchu.

- **Odběr č. 1a (TSA):** [doplnit výsledek KTJ]
- **Odběr č. 1b (Sabouradova půda):** [doplnit výsledek KTJ]

- **Odběr č. 2a (TSA):** [doplnit výsledek KTJ]
- **Odběr č. 2b (Sabouradova půda):** [doplnit výsledek KTJ]

[doplnit popis dalších odběrů]

Závěr:

Výsledky jsou ukazatelem znečištění daného povrchu a i s těmito výsledky lze nadále provádět diskusi.

Podpis osoby provádějící měření:

[doplnit jména]