ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Mikrobiální kontaminace vzduchových filtrů automobilových kabinových klimatizací

Microbial contamination of air filters in automobile cabin air-conditioning

Bakalářská práce

Studijní program:	Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor:	Zdravotní laborant

Autor bakalářské práce:	Natálie Klusová
Vedoucí bakalářské práce:	MUDr. Daniela Obitková

Kladno 2021

ČVUT
ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení:	**Klusová**	Jméno:	**Natálie**	Osobní číslo:	**487475**
Fakulta:	**Fakulta biomedicínského inženýrství**				
Garantující katedra:	**Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**				
Studijní program:	**Specializace ve zdravotnictví**				
Studijní obor:	**Zdravotní laborant**				

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Mikrobiální kontaminace vzduchových filtrů automobilových kabinových klimatizací

Název bakalářské práce anglicky:

Microbial contamination of air filters in automobile cabin air-conditioning

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude průkaz mikrobiální kontaminace vzduchových filtrů v automobilových kabinových klimatizacích. Obecná část bude pojednávat o mikrobech vyskytujících se přirozeně ve vzduchu, půdě a prachu a o možné kontaminaci klimatizačních filtrů mikroorganismy patogenními pro člověka. Praktická část bakalářské práce bude zaměřena především na bakterie. Kultivací budou prokázány života schopné mikroby. Následně bude provedena identifikace a zařazení bakterií kultivací získaných. Bakalářská práce bude zhodnocovat účinnost jednotlivých vzduchových filtrů používaných v automobilových kabinových klimatizacích.

Seznam doporučené literatury:

[1] 1. KLABAN, Vladimír, Obecná a environmentální mikrobiologie: fascinující, neuvěřitelný a tajemný svět mikrobů v přírodním prostředí. , Hradec Králové: Gaudeamus, 2018, ISBN 978-80-7435-673-5.
[2] MADSEN, Eugene L. , Environmental microbiology: from genomes to biogeochemistry.. ed. Second edition, Hoboken, New Jersey: Wiley Blackwell, 2015, ISBN ISBN 978-1-118-43963-0
[3] 3. MURRAY, Patrick R., Ken S. ROSENTHAL a Michael A. PFALLER, Medical microbiology, ed. 8th edition, Philadelphia, PA: Elsevier, 2016, ISBN 978-0-323-29956-5

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

MUDr. Daniela Obitková

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **21.9.2020**
Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2022**

prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vedoucí(ho) katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Mikrobiální kontaminace vzduchových filtrů v automobilových kabinových klimatizacích vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 12.05.2021

…….

Natálie Klusová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto formou velmi poděkovala vedoucí práce MUDr. Daniele Obitkové za cenné odborné a praktické rady, které mi v průběhu celé práce poskytovala. Zároveň velmi děkuji za veškerý čas, který mi věnovala a za zajištění hladkého průběhu praktické části práce v této době. Poděkování patří také Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. LF UK v Praze za poskytnutí prostor a přístrojového vybavení.

ABSTRAKT

Tématem bakalářské práce je mikrobiální kontaminace vzduchových filtrů v automobilových kabinových klimatizacích. Mikrobiální kontaminace byla zkoumána na vstupních a výstupních plochách celkem 21 vzduchových filtrů, které byly vyňaty z osobních automobilů při běžných údržbách po jednom roce provozu nebo ujetých 20 000 km. Na obou plochách filtrů byly provedeny suché stěry. Pro zachycení životaschopných bakterií byla provedena kultivace vždy na krevním a Mueller-Hinton agaru. K identifikaci jednotlivých kolonií bylo použito barvení dle Grama s imerzní mikroskopií a v případě filtrů 16 a 17 též proteomická studie. Identifikované bakterie byly kvantifikovány a výsledky kvantifikace v jednotkách tvořících kolonie (CFU/ml) porovnávány na vstupních a výstupních plochách filtrů. Filtr číslo 22 byl podroben testu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v podobě multiplex PCR v reálním čase.

Mezi identifikovanými bakteriemi převažovaly organismy rodů *Bacillus* a *Brevibacillus*. Nejhojněji byly zastoupeny *B. cereus, B. licheniformis* a *B. subtilis.* Kvantifikace prokázala výrazně nižší kontaminaci výstupních ploch na všech zkoumaných filtrech. PCR studie prokázala nepřítomnost nukleových kyselin patogenů zahrnutých v Respiratory panelu použitého pro multiplex PCR studii. Mezi identifikovanými mikroorganismy nebyly prokázány žádné lidské patogeny, které by mohly bezprostředně ohrožovat zdraví pasažérů v automobilech vybavených klimatizačním systémem.

Klíčová slova

Mikrobiální kontaminace; vzduchové filtry; proteomická studie; multiplex PCR; bakterie; kvantifikace; identifikace; CFU/ml

ABSTRACT

The topic of the bachelor's thesis is microbial contamination of air filters in automobile cabin air-conditioning. The microbial contamination was examined on the outlet and the inlet sides of 21 air filters taken out from the automobiles during regular maintenance after 1-year service or after 20 000 km. The samples from the outlet and the inlet sides were obtained by dry swabbing technique. Cultivation was performed on blood and MH agar in order to collect viable bacteria. For identifying the bacteria, we used Gram staining and imerse microscopy. Chosen colonies from filters 16 and 17 were also examined and identified by the proteomic study. Identified bacteria were quantified and the results were presented as CFU/ml (colony forming units/ml). The results of the quantification from the inlet and the outlet sides were compared. Filter 22 was examined via polymeraze chain reaction (PCR) using multiplex PCR in real time.

The majority of the identified bacteria was represented by the bacteria of the genera *Bacillus* and *Brevibacillus*. The most common bacteria were *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. cereus*. The contamination was visibly smaller on the outlet sides of the filters as it was shown by the quantification. No nucleic acids of human pathogens included in the Respiratory panel were found by multiplex PCR on both sides of the filter 22. During the experimental work, we have not found any pathogenic bacteria that could represent health risk for the passengers of automobiles equipped with air-conditioning system.

Keywords

Microbial contamination; air filters; proteomic study; multiplex PCR; bacteria; quantification; identification; CFU/ml

Obsah

1 Úvod 9

2 Cíle práce 10

3 Přehled současného stavu 11

3.1 Mikroflóra obecně 11

3.2 Lidská mikrobiota 12

3.2.1 Ústní mikrobiota 13

3.3 Mikroorganismy v ovzduší 16

3.4 Mikroorganismy v půdním prostředí 20

3.5 Mikroorganismy vyskytující se v prachu 24

3.6 Obecné fungování automobilové kabinové klimatizace 25

3.7 Vzduchové filtry v automobilových kabinových klimatizacích . 26

3.7.1 HEPA filtry 29

4 Metodika 31

4.1 Aseptické laboratorní techniky 31

4.1.1 Laminární box 31

4.2 Odběr vzorků – metoda s použitím stěrových tamponů 32

4.3 Kultivace přítomných agens 33

4.3.1 Kultivační půdy 33

4.3.2 Termostat 35

4.3.3 Anaerobní kultivace a anaerostat 35

4.4 Gramovo barvení 36

4.5 Imerzní mikroskopie 38

4.6 Kvantifikace počtu bakterií 38

4.7 Proteomická studie, MALDI Biotyper® system 39
4.8 Multiplex PCR 41
5 Výsledky 46
5.1 Odběr vzorků a kultivace 46
5.2 Gramovo barvení 47
5.3 Kvantifikace zachycených bakterií 48
5.4 Vyjádření účinnosti jednotlivých filtrů v procentech 51
5.5 MALDI Biotyper® System 52
5.6 Multiplex PCR 53
6 Diskuze 56
7 Závěr 60
8 Seznam použitých zkratek 61
9 Seznam použité literatury 62
10 Seznam použitých obrázků 73
11 Seznam použitých tabulek 74

1 ÚVOD

Přeprava automobilem je dnes velmi využívaným způsobem dopravy, a to jak ve sféře soukromé, tak ve sféře komerční. V dnešní době již není zvláštností, že téměř každá domácnost vlastní alespoň jeden vůz. Stejně tak není výjimkou využívání taxislužeb, zejména ve větších městech. Automobilová přeprava je součástí našeho života již více než 100 let, což samozřejmě znamená, že po technické stránce jsou automobily velmi vybavené. Součástí výbavy je u většiny automobilů také kabinová klimatizace, která reguluje teplotu v interiéru automobilu a co se týče nově vyráběných modelů, je klimatizační systém považován za samozřejmost.

Kabinová klimatizace musí být vybavena vzduchovým filtrem, který by měl každý rok, či každých ujetých 20 000 kilometrů podléhat výměně. Výměna vzduchového filtru je nutná z důvodu jeho životnosti, která je logicky spojena s jeho funkčností. Úkolem vzduchového filtru je filtrace vzduchu, který vstupuje do klimatizačního systému a následně se dostává do interiéru automobilu, kde je vdechován přítomnými pasažéry. Filtr zajišťuje jak odstraňování částic makroskopických, tak částic mikroskopických. Mezi částice makroskopické řadíme zejména prach a pyly, jejichž negativní vliv na lidské zdraví je obecně znám. Mezi částice mikroskopické řadíme zejména bakterie, viry či mikroskopické houby.

Existuje široká škála mikroorganismů, které se mohou vyskytovat ve vzduchu, který se dostává do klimatizačního systému automobilu. Zejména se zde mohou nacházet mikroorganismy přirozeně přítomné ve vzduchu, v půdě, v ústní dutině člověka či v již zmíněném prachu. Majitelé, či pasažéři automobilů vybavených kabinovou klimatizací si často tuto skutečnost nemusí uvědomovat a tím pádem neklást dostatečný důraz na dodržení daných lhůt na výměnu vzduchového filtru, přičemž využívání vzduchového filtru, který ztratil svou funkčnost, může být spojeno s určitými riziky pro lidské zdraví.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce je mikrobiologický průkaz mikroorganismů přítomných na vzduchových filtrech v automobilových kabinových klimatizacích.

Cílem teoretické části je seznámení s mikroorganismy vyskytujícími se ve filtrovaném vzduchu. Teoretická část dále objasňuje fungování automobilové kabinové klimatizace a podrobně popisuje fungování vzduchových filtrů, dále konkrétně fungování HEPA filtrů.

Praktická část bakalářská práce má za cíl izolaci vzorků ze vstupních a výstupních ploch vzduchových filtrů, kultivaci na mikrobiologických půdách s následnou identifikací konkrétních mikroorganismů. Identifikace je prováděna pomocí Gramova barvení s následnou mikroskopií, použitím selektivních půd či kultivace v anaerostatu a pomocí proteomické studie. Identifikované mikroorganismy jsou následně kvantifikovány.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

V následující kapitole se bude práce věnovat převážně bakteriím přirozeně se vyskytujícím ve vzduchu, půdě, prachu a v ústní dutině člověka. Dalším tématem následující kapitoly bude fungování klimatizačního systému v automobilech a filtry v nich využívaných. Automobilová doprava je nejčastějším způsobem dopravy a automobil v dnešní době vlastní téměř každý. Automobily jsou velmi hojně využívány také v přepravních službách, převážně po městech.

Vzduchové filtry kabinových klimatizací by měly podléhat pravidelným kontrolám a výměnám, aby nedocházelo k jejich příliš velkému opotřebení a s tím spojenou ztrátou jejich funkčnosti. Vzduchové filtry v každém automobilu by měly být měněny jednou za rok, či za každých ujetých 20 000 km při pravidelné údržbě.

3.1 Mikroflóra obecně

Termín mikroflóra je složeninou slov „*mikro*" a „*flóra*". Označení flóra je běžně užíváno pro rostliny vyskytující se v určité oblasti. Označení mikroflóra tedy charakterizuje soubor mikroorganismů vyskytujících se v určitém definovaném místě, kterým může být vodní nádrž, konkrétní potravina, či ústní dutina člověka. Mikroflóra obecně zahrnuje bakterie, kvasinky a plísně [1].

Termín mikroflóra je v poslední době v odborné literatuře nahrazován označením mikrobiota či mikrobiom, proto bude dále v textu využíváno toto označení [1].

3.2 Lidská mikrobiota

Lidský plod se do momentu narození vyskytuje v těle matky ve své podstatě ve sterilním prostředí. Tento fakt se ovšem dramaticky mění po narození, kdy je dítě exponováno bakteriím, mikroskopickým houbám a virům od matky a z vnějšího prostředí. Během prvních let života se tedy u každého člověka formuje mikrobiota, která osidluje kůži, ústa, gastrointestinální trakt a v neposlední řade trakt urogenitální. Mikrobiota hraje velmi důležitou roli v metabolických a imunologických procesech v těle člověka. Narušení přirozené mikrobioty může tedy vyústit v onemocnění různého druhu [2].

Díky rozsáhlé studii „*The Human Microbiome Project*", která trvala 5 let se podařilo zanalyzovat genetické složení mikroorganismů žijících v organismu zdravých jedinců. Studie prokázala, že bakteriální buňky početně převyšují buňky lidského organismu v poměru 10:1. V číslech žije ve střevech a na kůži člověka zhruba 10^{14}, tedy sto tisíc miliard bakterií. Bylo dokázáno, že bakterie kolonizující střeva jsou odlišné od těch kolonizujících ústní dutinu, vaginu, kůži, či další části těla [1; 2].

U 95 % a více jedinců se vyskytuje stabilní jádro mikrobiomu, což znamená, že drtivá většina jedinců má stejný genetický základ mikroorganismů, které vytvářejí jejich mikrobiotu. Stabilní jádro mikrobiomu je tedy málo druhově variabilní, ale početně tvoří značnou část z celkové mikrobioty. Největší množství sdílených druhů se nachází v mikrobiotě ústní dutiny, dále v mikrobiotách nosu, střeva a kůže. Nejvíce různorodý soubor mikroorganismů se vyskytuje v ženské vagině. Zbytek lidského mikrobiomu – sekundární mikrobiom, je druhově velmi variabilní, ale početně méně zastoupen. Sekundární mikrobiom může být u různých jedinců složen z jiných druhů mikroorganismů. Je patrné, že nejdůležitější pro správné fungování organismu je stabilní jádro mikrobiomu. Bylo by však chybné domnívat se, že sekundární

mikrobiom je méně důležitý. Veškeré funkce, které zajišťuje však mohou být zastoupeny širokou paletou mikroorganismů [2].

Logicky, vztah mezi lidským organismem a jeho mikrobiotou je symbiotický a fyziologická mikroflóra našeho organismu zajišťuje správnou metabolickou a imunologickou aktivitu a také ochranu před mikroorganismy patogenními [2].

3.2.1 Ústní mikrobiota

Ústní mikrobiota je velmi rozmanitá, a to převážně díky neustálému kontaktu ústní dutiny s externím prostředím. Ústní dutina nabízí různorodé prostředí, které je reprezentováno jazykem, zuby, dásněmi, měkkým a tvrdým patrem, tvářemi a mandlemi. Veškerá tato místa vykazují výrazně odlišné složení mikrobioty. Celá ústní dutina obsahuje zhruba 600 druhů bakterií, jejichž postupná identifikace se provádí pomocí kultivačních a molekulárně biologických metod, jako například 16S RNA klonování či PCR amplifikace. Na vytvoření mikrobioty se podílí široká škála aspektů, kterými jsou pH, přijímaná potrava a stravovací návyky. V kolonizaci ústní dutiny převažují rody *Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Neisseria* a *Saccharibacteria.* Celkovou mikrobiotu ústní dutiny je však velmi těžké popsat, jelikož ústa jsou místem, kde se vyskytují exogenní bakterie z potravy, vody a vzduchu. Mikrobiota může být dále ovlivněna i sociálními kontakty jedince [3; 4; 5].

Bakterie, funghi a protozoa vytvářejí své kolonie na mnohých površích v ústní dutině, kde dochází k tvorbě biofilmů. Mikrobiální biofilmy jsou přítomny na bukální mukóze, na kořeni jazyka, na zubech a na dásňovém žlábku. Bakteriální biofilm označuje blánu či slizký povlak vytvořený bakteriemi a jeho tvorba počíná fází atrakce a končí fází disperze. Nejznámějším lidským biofilmem je patrně biofilm na povrchu zubní skloviny, který je tvořen zejména

bakteriemi rodu *Neisseria* a *Streptococcus.* Mnohé studie poukazují na nevyváženou ústní mikrobiotu a s tím spojená onemocnění, mezi která patří například zubní kazy, periodontální onemocnění, diabates mellitus 2. typu a další [3; 6].

Mezi významné zástupce ústní mikrobioty patří:

- Ústní (orální) streptokoky
- *Neisseria spp.*
- *Staphylococcus spp.*
- *Micrococcus spp.* [7].

Vypsaní zástupci ústní mikrobioty tvoří rezidentní mikrobiotu v ústech a budou jednotlivě konkrétněji popsáni.

- **Ústní (orální) streptokoky**

Ústní (orální) streptokoky jsou v literatuře často označovány také jako viridující streptokoky a tvoří významnou část přirozené ústní mikrobioty, ale také horních cest dýchacích. Označení viridující streptokoky vychází z toho, že tato skupina baterií se projevuje α-hemolýzou na krevním agaru. Orální streptokoky patří mezi grampozitivní bakterie a řadíme do této skupiny: *Streptococcus mutans, Streptococcus salivarius, Streptococcus milleri, Streptococcus sanguinis, Streptococcus mitis a Streptococcus pneumoniae* [8].

Orální streptokoky patří mezi oportunní patogeny, což znamená, že i přesto, že jsou součástí fyziologické ústní mikrobioty, mohou být původci onemocnění. Infekcím orálními streptokoky však většinou předcházejí jiná onemocnění či infekce. V takovém případě mohou orální streptokoky vyvolávat

bakteriémii, meningitidu, abscesy či pneumonii. Na vzniku zubního kazu se významně podílí *Streptococcus mutans* [8].

Streptokokové infekce se přenášejí kapénkovým přenosem, kontaminovanými předměty či orálním sexem [8].

- ***Neisseria spp.***

Rod *Neisseria* zahrnuje bakterie patřící do skupiny gramnegativních aerobních diplokoků. Bakterie rodu *Neisseria* jsou primárně patogenní, ale ústní dutina je osídlena nepatogenními druhy bakterií tohoto rodu. Ústní mikrobiotu tvoří *Neisseria sicca, Neisseria subflava, Neisseria flavescens, Neisseria mucosa, Neisseria meningitidis* [9; 10].

- ***Staphylococcus spp***.

Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou grampozitivní koky, které se vyskytují ve shlucích, jsou nesporulující, nepohyblivé a povětšinou neopouzdřené. Stafylokoky dělíme na základě plazmakoagulázového testu na koaguláza pozitivní a koaguláza negativní [11].

Ústní mikrobiotu tvoří *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureu*s. Obě zmíněné bakterie mohou působit jako oportunní patogeny, *S. epidermidis* napadá převážně oslabené a imunokompromitované jedince. *S. aureus* způsobuje velmi často záněty a abscesy, a to opět zejména u oslabených jedinců [10; 11].

- ***Micrococcus spp.***

Nejvýznamnějším zástupcem rodu *Micrococcus* je *Micrococcus luteus*, tedy gram pozitivní kok o velikosti v rozmezí zhruba 0,5 – 3 μm. Bakterie tohoto rodu se vyskytují fyziologicky v organismu člověka, ale mohou být patogeny pro

imunokompromitované jedince, kdy mohou způsobovat bakteriémie, septický šok, endokarditidu a další [12].

Micrococcus luteus je významnou součástí lidské mikrobioty, ale tvoří také součást mikrobioty půdy, prachu, vody a vzduchu. V lidském organismu osidluje okolí potních žláz, dutinu ústní a horní cesty dýchací. Jak již bylo řečeno, bakterie rodu *Micrococcus* jsou oportunní patogeny, *M. luteus* tedy není výjimkou a u oslabených jedinců může způsobovat převážně kožní infekce [13].

3.3 Mikroorganismy v ovzduší

Ovzduší je pro mikroorganismy obecně velmi nepříznivé prostředí, jelikož neposkytuje téměř žádné živiny a zároveň zde nepříznivě působí sluneční záření. Zemská atmosféra je rozdělena do několika vrstev, z nichž nejníže položená je troposféra. Na úrovni troposféry je vzduch neustále v pohybu a jeho teplota se snižuje s rostoucí výškou. Mikroorganismy se vyskytují nejčastěji v její dolní části, a to převážně ve formě spor. V ovzduší se tedy vyskytují bakterie sporulující [14].

Ovzduší však slouží jako velmi významný vektor při přenosu onemocnění. Mikroby se při kašlání, kýchání, ale i při normálním dýchání mohou vyskytovat v ovzduší ve formě aerosolu a mohou být ve formě kapénkové infekce přenášeny na zdravé jedince. Stejně jako v lidském těle, tak i v ovzduší je specifická mikrobiota. Mikrobiota volného ovzduší se liší od mikrobioty ovzduší uzavřených prostor [14].

Ve volném ovzduší se vyskytuje méně mikrobů v zimě, kdy je atmosféra vlhčí než v ostatních ročních obdobích, tudíž dochází k strhávání mikrobů kapénkami k zemi. Naopak v ovzduší uzavřených prostor se během zimního období vyskytuje mikrobů více, čemuž přispívá méně časté větrání. Stejně jako

ve volném ovzduší, i v ovzduší uzavřených prostor se mikroby vyskytují v nižších vrstvách, tedy převážně nad podlahou. Zdrojem mikroorganismů v ovzduší jsou lidé, zvířata, případně půda. V ovzduší nad zemědělskými a průmyslovými oblastmi se tedy vyskytuje větší množství mikroorganismů něž nad oblastmi zalesněnými či skalnatými [14].

V ovzduší jsou přítomné následující rody bakterií – *Bacillus, Clostridium, Streptococcus, Flavobacterium, Methylobacter, Sphingomonas* [15].

Rod *Bacillus* obsahuje 181 druhů. Bakterie tohoto rodu jsou grampozitivní, sporulující tyčinky, které mohou ve své délce dosahovat až 10 μm. Jednotlivé druhy jsou aerobní či také fakultativně anaerobní. Typickou vlastností bakterií rodu *Bacillus* je tvorba endospor. Tato vlastnost jim umožňuje přežít v nepříznivých podmínkách, které ve vzduchu obecně panují, jelikož ve formě spor odolávají chladu, teplu, vyschnutí, většině desinfekčních činidel a také elektromagnetickému záření [16].

Tvorba spor je pro bakterie poměrně náročným procesem, při kterém je důležitá přítomnost živin. Proces je označován jako diferenciační, a dochází při něm v buňce k řadě změn. Jedná se o změny morfologické, fyziologické a biochemické, které jsou všechny řízeny na genetické úrovni. Jakmile se spora dostane do příznivých podmínek, dochází ke germinaci, spora klíčí a přeměňuje se zpět ve vegetativní buňku. Spora je dormantní útvar a bakterie rodu *Bacillus* mohou díky této vlastnosti přežívat až tisíce let [17].

Jednotlivé druhy rodu *Bacillus* se nevyskytují pouze ve vzduchu, ale také ve vodě, v prachu, v půdě, na rostlinách či na hmyzu a zvířatech. Z důvodu jejich hojného výskytu patří mezi časté kontaminanty pokrmů v potravinářství či vzorků v mikrobiologických laboratořích. Kultivace bakterií tohoto rodu není náročná, rostou velmi dobře na běžných kultivačních médiích. Patogenními

druhy rodu *Bacillus* jsou *Bacillus cereus* a *Bacillus anthracis*, ostatní druhy jako *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* či *Bacillus coagulans* vyvolávají lidská onemocnění jen výjimečně [16].

- ***Bacillus cereus***

Bacillus cereus na rozdíl od *Bacillus anthracis* netvoří pouzdro a na krevním agaru je od ostatních příslušníků rodu *Bacillus* odlišitelný díky tomu, že okolo kolonií vzniká zóna úplné hemolýzy. Jedná se o patogenní druh, a to zejména díky tomu, že disponuje širokou škálou toxinů a faktorů virulence, mezi které patří například produkce hemolysinů, fosfolipázy a enterotoxinů [16].

Onemocnění je ve většině případů zapříčiněno kontaminací potravy, kterou může *Bacillus cereus* kontaminovat jak ve formě vegetativní, tak ve formě spor. Vegetativní formy nejsou schopné přežít var, ale spory ano, jelikož jsou termorezistentní. Jakmile je potravina ochlazena zpět na pokojovou teplotu, spory mohou germinovat a začít produkovat enterotoxiny. Onemocnění se projevuje dvěma způsoby, které jsou označovány jako syndrom emetický a syndrom průjmový. Syndrom emetický je způsoben termostabilním toxinem emetickým, který není zničen varem a k jeho produkci dochází již na kontaminované potravě. Tento syndrom se projevuje rychlým nástupem zvracení po konzumaci dané potraviny. Syndrom průjmový je způsoben termolabilním toxinem průjmového syndromu, který je produkován ve střevě potom, co je zkonzumována kontaminovaná potravina. Tento syndrom se projevuje průjmem, který nastupuje zhruba po 8–16 hodinách po konzumaci dané potraviny. Otrava z potravin obvykle trvá 24 hodin a odeznívá bez nutnosti terapie. Prevencí je řádné uvaření potravy a její konzumace co nejdříve po její přípravě. Onemocnění s obdobným průběhem může být výjimečně způsobeno také *Bacillus subtilis*, či *Bacillus licheniformis* [16; 18].

- ***Bacillus subtilis***

Bacillus subtilis je grampozitivní, sporulující bakterie, která stejně jako ostatní druhy rodu *Bacillus* osidluje mnohá místa. Bakterie byla dříve označována jako obligátně aerobní, ale bylo zjištěno, že je schopná růst i v anaerobních podmínkách. Jedná se o bakterii považovanou za nepatogenní, ale jak již bylo zmíněno, může kontaminovat potravu a způsobovat podobné onemocnění jako *Bacillus cereus*. Její spory jsou velmi odolné a mohou přežívat ve vodě o teplotě 100 °C po dobu 4 hodin, ve vodě o teplotě 80 °C přežívají dokonce až 75 hodin. *B. subtilis* je používán jako modelový organismus pro zkoumání diferenciačního procesu, ke genovým manipulacím či jako biologická ochrana rostlin [17; 19].

Již bylo zmíněno, že *Bacillus subtilis* osidluje velké množství míst. Bakterie se vyskytuje napříč životním prostředím a bylo dokázáno, že je schopna také kolonizovat gastrointestinálního trakt zvířat. Bylo zjištěno, že bakterie patřící do rodu *Bacillus* se vyznačují vysokou genomovou diverzitou a byla identifikována přítomnost kmenově specifických genů, které by mohly vysvětlovat široký výskyt této bakterie. *B. subtilis* je možno izolovat z půdy, ale také z vodních prostředí nebo ze vzduchu, což může vyvolávat dojem, že je tato bakterie téměř všudypřítomná a že je adaptována životu v různých prostředích. Její hojný výskyt může být odůvodněn tím, že bakterie je schopná vytvářet vysoce rezistentní endospory, které se mohou jednoduše dostávat do vzduchu. Spory mohou vzduchem migrovat na velmi dlouhé vzdálenosti. Na místech, kam se dostanou však nemusí nikdy dojít k jejich germinaci. Proto, pokud je *B. subtilis* izolován z určitého vzorku, nemusí to nutně znamenat, že na tomto místě opravdu rostl. Stále tedy není naprosto jasné, ve kterých prostředích tato bakterie opravdu roste. Pomocí fluorescenční mikroskopie, která využívá speciálně značených protilátek, můžeme však rozlišit vegetativní formu bakterie od spory.

Tato metoda byla využita a bylo zjištěno, že v půdě se *B. subtilis* vyskytuje ve formě vegetativní, a to převážně pokud je zde zároveň přítomen organický materiál podléhající rozkladu. Tato skutečnost by mohla naznačovat, že je bakterie saprofytická [20].

3.4 Mikroorganismy v půdním prostředí

V půdě mohou žít bakterie, viry, kvasinky, plísně či makroskopické organismy. Soubor vyjmenovaných a dalších organismů žijících v půdě je nazýván jako edafobiont. Pojem zahrnuje veškeré organismy, které žijí v půdě. Půda jako celek je kombinací neživých a živých složek, vzniká na základě půdotvorných faktorů a je tvořena fází plynnou, kapalnou a pevnou [21].

Zhruba v hloubce 15 cm pod povrchem se vyskytuje tzv. orniční vrstva, která je nejvíc mikrobiologicky aktivní. S rostoucí hloubkou od orniční vrstvy klesá počet i aktivita mikroorganismů. Soubor všech organismů, které žijí v půdě se souhrnně označuje jako edafon, který můžeme dále dělit na fytoedafon a zooedafon. Fytoedafon zahrnuje rostlinné organismy (bakterie, plísně, houby, sinice, rozsivky a zelené řasy) žijící v půdě, ale nezahrnuje rostliny v půdě pouze kořenící. Zooedafon zahrnuje veškeré živočichy žijící v půdě, tedy jak živočichy mikroskopické, tak makroskopické [21]. Hlavní složku edafonu tvoří mikroorganismy, kterých je v půdě obrovské množství, je však velmi těžké konkrétně určit jejich počet či prostudovat jejich jednotlivé funkce, jelikož mnohé jsou nekultivovatelné. I přesto, že valná většina půdních mikroorganismů je zatím neprobádaná, můžeme souhrnně určit jejich vlastnosti:

- schopnost přežít a adaptovat se extrémním podmínkám;
- schopnost udržet si životaschopnost až miliony let;
- schopnost rozložit jakoukoli organickou látku;
- schopnost podílet se na rozkladu organických polymerů;

- schopnost transformovat organickou hmotu i biogenní prvky;
- schopnost fixovat atmosférické prvky a akumulovat je v biomase [22].

Schopnost rozložit jakoukoli organickou látku mají převážně bakterie, které tvoří nedílnou součást edafonu. Počet bakterií v 1 g půdy dosahuje 10^6 až 10^9 a tvoří tak dominantní část půdních mikroorganismů. Celkový počet je však vždy nutné udávat spolu s obsahem vody v půdě, jelikož je na tomto parametru závislý. Existují odhady, které předpokládají, že pokud by vymizely veškeré půdní mikroorganismy, život na Zemi by přestal existovat do 30 let od dané chvíle. Půdní bakterie mají schopnost rozložit přirozené makromolekuly, ale také xenobiotické sloučeniny. Na rozkladu odumřelé biomasy se půdní bakterie podílí zejména s půdními houbami, ale i s dalšími složkami edafonu. Velmi důležitou vlastností půdních bakterií je produkce bioaktivních látek, zejména látek, které se v lékařství využívají jako antibiotická léčiva při bakteriálních infekcích. Nejvýznamnějším zástupcem je v tomto případě rod *Streptomyces*, který patří do kmenu Aktinobakterií. Streptomycety mají velmi rozvinutý sekundární metabolismus a tato skupina byla nejvíce proslavena díky prvnímu účinnému antibiotiku používaném v léčbě tuberkulózy – streptomycinu. Nejsou však producenty pouze streptomycinu, ale také celé řady dalších antibiotik [21; 22].

Další běžně se vyskytující bakterie v půdě patří do rodů *Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Flavobacterium, Nocardia, Pseudomonas, Streptomyces, Clostridium* a *Desulfovibrio*, které dohromady s mnoha dalšími tvoří bakteriocenózu, tedy půdní společenstvo bakterií. Nelze však opomenout houby jako součást půdní biomasy, mezi nejvýznamnější a zároveň nejhojněji zastoupené zástupce patří plísně rodu *Aspergillus* a *Penicillium* [21].

Vybraní zástupci bakteriocenózy:

- ***Bacillus licheniformis***

Bacillus licheniformis je grampozitivní bakterie produkující endospory. Jedná se o saprofytický organismus žijící v půdě a na rostlinách. Taxonomicky je *B. licheniformis* velmi podobný *Bacillus subtilis*. Bakterie rodu *Bacillus* jsou z valné většiny aerobní, *B. licheniformis* je však fakultativně anaerobní. Díky svým extracelulárním produktům, které nacházejí komerční využití, je bakterie velmi zajímavá. Využívá se kupříkladu k výrobě enzymů, antibiotik a aminopeptidáz. Dále mohou být pomocí *B. licheniformis* průmyslově vyráběny proteázy, jako α-amyláza, penicillináza, β-manáza či cycloglukosyltransferáza. Proteázy obecně jsou využívány ve výrobě detergentů a amylázy při hydrolýze škrobu, při odšlichtování textilií nebo při dimenzování papíru. Určité kmeny této bakterie jsou využívány také k výrobě peptidových antibiotik nebo speciálních chemikálií. Genom bakterie byl opakovaně analyzován, aby byla zhodnocena důležitost jejího biotechnologického přínosu. V průběhu let bylo osekvenováno velké množství různých kmenů *B. licheniformis*, aby byla zjištěna skutečná šíře průmyslového potenciálu tohoto organismu. Sekvenování kmene *B. licheniformis* izolovaného z lidské stolice odhalilo přítomnost genů stresové reakce, genů determinujících rezistenci na antibiotika nebo genů rezistence na toxické sloučeniny, které mají významnou biotechnologickou hodnotu [23].

- **Aktinomycety**

Aktinomycety tvoří heterogenní skupinu grampozitivních bakterií, jejichž DNA vykazuje velké množství párů guanin-cytosin. Kromě půdy se vyskytují také ve vodních ekosystémech [24].

Aktinomycety mohou připomínat houby, zejména kvůli tomu, že jsou schopné tvořit mycelium a rozmnožovat se sporami. Stavba jejich buňky je však prokaryotická. Jak již bylo zmíněno, jedná se o bakterie hojně rozšířené, z nichž některé vykazují patogenní působení na lidský organismus, či také na zvířata nebo rostliny. Jejich důležitou úlohou v půdě je rozklad organických látek. Do skupiny aktinomycet řadíme čeledi *Actinomycetaceae, Actinoplanaceae, Dermatophilaceae, Mycobacteriaceae* a *Streptomycetaceae* [25].

- ***Brevibacillus laterosporus***

Bakterie rodu *Brevibacillus* byly dříve řazeny do rodu *Bacillus*, ale na základě odlišných fysiologických a biochemických vlastností byl vyčleněn samostatný rod *Brevibacillus.* Bakterie tohoto rodu jsou krátké rovné pohyblivé tyčky, které jsou grampozitivní, ale mohou být také gramvariabilní. Většina bakterií tohoto rodu je aerobní a vyskytují se samostatně, v páru nebo seřazeny v krátkých řetízcích. Jedná se o sporulující bakterie, jejichž spory jsou oválné a ztlušťují tím mateřkou buňku. Do rodu *Brevibacillus* patří 14 druhů. Jednotlivé druhy byly většinou izolovány z půdy, vody a z potravin. Ojediněle byly izolovány z lidského biologického materiálu [26].

Brevibacillus laterosporus byl izolován z mnohých materiálů, jako zejména z půdy, z drahokamů, z mořské vody, z těl hmyzu, z listů, ale také z mléka, sýru či z medu. Jeho výskyt je tedy hojný. Bakterie je patogenní pro bezobratlé živočichy, zejména pro hmyz, hlísty a pro měkkýše, ale také pro patogeny rostlin, proto je využívána jako biopesticid. Dále je využívána také v lékařství, jelikož bylo zjištěno, že je schopna produkovat některá významná antibiotika [27].

- ***Brevibacillus brevis***

Brevibacillus brevis je aerobní, sporulující, grampozitivní bakterie, která se vyskytuje napříč životním prostředí, převážně v půdě. Bakterie rodu *Brevibacillus* jsou známé produkcí antimikrobiálních peptidů a *Brevibacillus brevis* konkrétně produkuje gramicidin. Bakterie je využívána velmi hojně v zemědělském průmyslu pro fermentaci potravin. Jak již bylo řečeno, bakterie tohoto rodu jsou patogenní jen ojediněle, přesto byly popsány případy, kdy byly původci onemocnění u imunokompromitovaných jedinců, u intravenózních narkomanů, u obětí popálenin, u pacientů na dialýze či u pacientů po ortopedických nebo neurochirurgických zákrocích. Je znám případ, kdy konkrétně *Brevibacillus brevis* byl původcem bakteriální peritonitidy u pacienta s hepatocelulárním karcinomem či původcem bakteriální tracheitidy u pacienta přijatého na jednotku intenzivní péče [28].

3.5 Mikroorganismy vyskytující se v prachu

Prach je tvořen směsí různě velkých pevných částic. Tyto částice můžeme dělit na složku organickou a složku anorganickou. Mezi hlavní součásti organické složky prachu patří bakterie a metabolity roztočů, které jsou mimo jiné zodpovědné za hypersenzitivní reakce imunitního systému v podobě alergií. Jednotlivých částic podílejících se na tvorbě prachu je velké množství a z hlediska prachové mikrobioty můžeme pozorovat rozdíly mezi prachem vnitřních prostor a prachem vyskytujícím se ve venkovním prostředí. V interiéru automobilu může být jak prach typický pro venkovní prostředí, tak prach typický pro prostory vnitřní [29; 30; 31].

Většina prachové mikrobioty vnitřních prostor je tvořena mikroorganismy, které se běžně vyskytují ve vzduchu, v půdě, v organismu člověka nebo zvířat a na povrchu rostlin. Konkrétní složení však vždy záleží na

charakteru vnitřního prostoru. Mohou například existovat rozdíly mezi prachovou mikrobiotou rodinných domů a interiérem automobilů. Téměř 60 % prachové mikrobioty tvoří houby rodů: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor* a *Penicillium*. Bakterie tvoří 1–25 % prachové mikrobioty. V prachu vnitřních prostor dominují grampozitivní bakterie, které jsou úzce spjaty s lidskou mikrobiotou, zejména rody *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* a *Micrococcus*. V prachu vnějšího prostředí se vyskytují bakterie rodů *Acidovorax* a *Brevundimonas*, které jsou součástí vodní a půdní mikrobioty. Významnou součástí mikrobioty prachu jsou samozřejmě také sporulující bakterie rodu *Bacillus* [30; 31; 32].

3.6 Obecné fungování automobilové kabinové klimatizace

Automobilová kabinová klimatizace se skládá z kompresoru, kondenzátoru, výparníku, chladiva, expanzního ventilu, filtru a elektronického ovládacího systému. Chlad vycházející z klimatizačního systému však není přímo vyráběn klimatizačním systémem, jelikož k ochlazování dochází přenosem tepla z ochlazované látky na látku chladící. Chladící látka na základě dané teploty a tlaku přechází mezi kapalnou a plynnou fází a tento přechod je doprovázen uvolňováním velkého množství tepla. Za atmosférického tlaku se chladící látka vyskytuje ve fázi plynné. Do celého oběhu je nutno dodávat práci, jelikož pracuje na základě obráceného Carnotova cyklu, při kterém následně dochází k přeměně dodané práce na teplo [33].

Kompresor zajišťuje proudění chladiva v okruhu. Během adiabatické komprese dochází ke zmenšování objemu chladící látky a k jejímu zahřátí na zhruba 65 °C. Při kompresi izotermické naopak probíhá zvýšení objemu chladící látky, která přechází do stavu kapalného a její teplota se snižuje zhruba o 10 °C. Kompresor nesmí nasát chladivo v kapalné fázi, před čímž je chráněn akumulátorem, který zajišťuje odstraňování vlhkosti z chladiva a jeho filtraci.

Chladící medium se následně dostává do expanzního ventilu, kde dochází ke snížení jeho objemu a teplota klesá až k -7 °C, zde se chladící látka nachází ve stavu nasycené páry. Z expanzního ventilu přechází medium do výparníku, kde se vypařuje a přijímá teplo z okolního vzduchu, čímž ho ochlazuje. Ve výparníku medium přechází do stavu přehřáté páry a jeho teplota se zvyšuje na 1 °C. Z výparníku se chladivo přesouvá zpět do kompresoru a cyklus se může opakovat. Výparník je zároveň umístěn v topném a ventilačním systému vozu, které zajišťují rozvádění vzduchu do interiéru vozu [33; 34].

Na celém ději se podílí také kondenzátor, který v klimatizačním okruhu zprostředkovává přenos tepla mezi chladivem a okolním prostředím. Součástí kondenzátoru jsou dva ventilátory, které zajišťují rychlé proudění vzduchu skrz kondenzátor [34].

3.7 Vzduchové filtry v automobilových kabinových klimatizacích

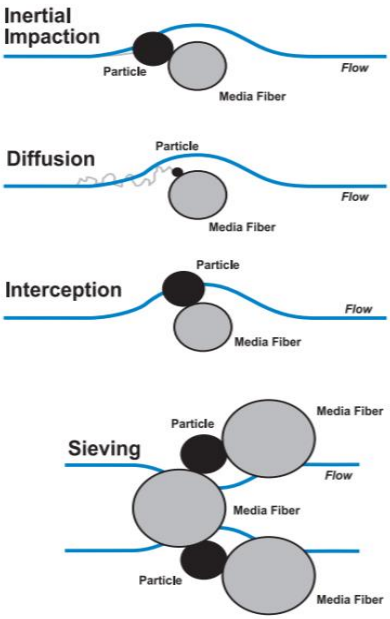
Dle normy ČSN EN 779 z roku 2012 jsou vzduchové filtry děleny dle tříd filtrace, kdy třídy filtrace G1–G4 se využívají u filtrů na hrubý prach, třída filtrace M5–M6 nachází využití u filtrů na středně hrubý prach a třída filtrace F7–F9 je využita pro skupinu filtrů na prach jemný. Nároky na vzduchové filtry jsou dále popsány v normě ČSN EN 1822-1 z roku 2010 a jsou opět dle třídy filtrace rozděleny na filtry EPA, HEPA a ULPA [35].

Kvalita a uspořádání vzduchových filtrů hrají hlavní roli v udržování čistoty vzduchu. Jak již bylo naznačeno, existuje poměrně velké množství dostupných vzduchových filtrů, které jsou vhodné pro filtraci částic. Filtry můžeme dělit na základě mechanismu filtrace také na elektrostatické a mechanické. Mechanické filtry mohou obsahovat aktivní uhlí, které se využívá pro odstranění pachů, výparů a těkavých organických sloučenin [36].

Označení filtr je někdy využíváno nesprávně, například co se týče plynových či vzduchových čistících přístrojů. Toto označení by správně mělo být využíváno pro pórovitou hmotu, přes kterou prochází plyn a dochází na ní k separaci přítomných částic. Struktura filtru disponuje poměrně velkou pórovitostí, aby mohl snadno procházet nosný plyn. Prostor mezi jednotlivými vlákny, která tvoří filtr, je větší než jednotlivé částice, které má filtr shromažďovat. Jednoduché filtry však mohou fungovat na principu prosévání, kdy jsou mezi jednotlivými vlákny velmi malé prostory a v těchto prostorách dochází k záchytu jednotlivých částic a znemožnění jejich průchodu filtrem. Primárními mechanismy filtrace jsou setrvačnost, difúze a intercepce. Důležitým faktorem při filtraci je samotná velikost částic, která je zároveň nejdůležitější vlastností aerosolu, jelikož čím menší jsou částice, tím stabilnější je aerosol. Čím stabilnější aerosol je, tím náročnější je oddělit částice z plynné fáze, ve které jsou suspendovány. Velmi často se určuje průměr částic, jakožto dynamický parametr určující jejich velikost. Je dopočítán dle vzorce a označován jako aerodynamický ekvivalentní průměr [37].

Jak již bylo uvedeno, hlavními mechanismy využívanými během filtrace jsou setrvačnost, difúze a intercepce. Graficky jsou tyto mechanismy znázorněny na obrázku 1, který také zobrazuje proudící vzduch kolem dané částice. Částice, která se dostane do oblasti proudění vzduchu kolem vlákna filtru, musí následovat zakřivenou trajektorii proudícího vzduchu, pokud se chce dostat dále přes vlákno. Jakmile částice získají dostatečnou setrvačnost, díky své vyšší hybnosti, která je relativní vůči molekulám nosného plynu, jsou schopny odolat zakřivení způsobenému proudícím vzduchem a přijdou do kontaktu s vláknem. V tomto případě se tedy jedná o zachycení částice setrvačností. Popsaný efekt je tím vyšší, čím vyšší je aerodynamický ekvivalentní průměr a čím vyšší je rychlost vzduchu, který proudí kolem vlákna. Pokud jsou částice naopak příliš malé, mají tendenci opisovat zakřivenou trajektorii proudícího vzduchu, což znamená, že

mají menší setrvačnost. V takovém případě se však částice pohybují Brownovým pohybem, což je náhodný pohyb mikroskopických částic. Proto, pokud proud vzduchu prochází velmi blízko kolem povrchu vlákna, některé náhodné pohyby okolo proudu vzduchu mohou zapříčinit, že se částice dostanou do kontaktu s povrchem vlákna a budou zde adherovat pomocí Van der Waalsových sil. V takovém případě se bude jednat o filtraci difúzí. Čím menší částice budou, tím silnější bude Brownův pohyb a tím efektivnější bude filtrace difúzí. K filtraci intercepcí dochází, pokud se částice pohybuje v proudu vzduchu, který proudí kolem vlákna v rádiusu jedné částice – tehdy dojde ke kontaktu částice s vláknem a k adhezi. Intercepce je lepší, pokud se průměr vlákna blíží geometrickému průměru dané částice. Intercepce tedy není závislá na rychlosti proudícího vzduchu [37; 38].

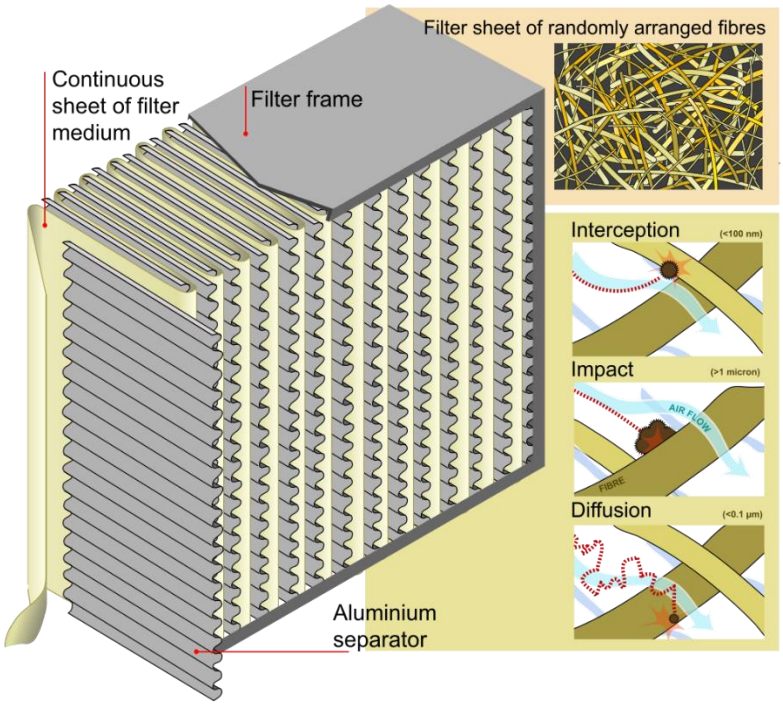


Obrázek 1: Jednotlivé mechanismy filtrace – filtrace setrvačností, difúzí, intercepcí a prosévání [38].

3.7.1 HEPA filtry

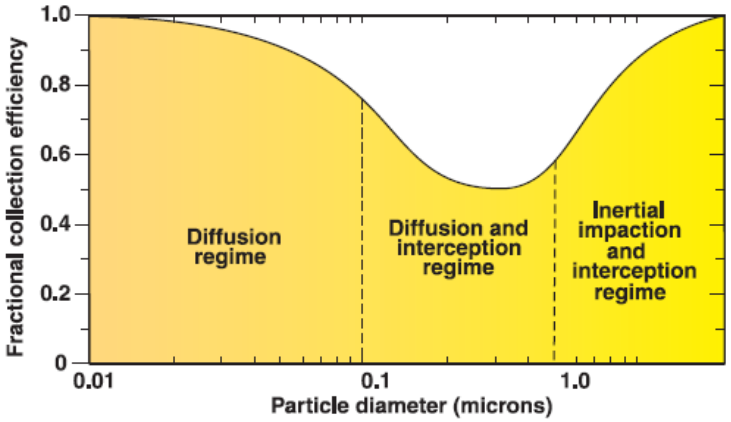
HEPA, neboli „*high efficiency particulate air filter*", filtr byl vyvinut ve vojenském prostředí na počátku čtyřicátých let dvacátého století za účelem ochrany před radioaktivními částicemi. HEPA filtry byly následně představeny široké veřejnosti a začaly být komerčně využívány jako ochrana před viry, bakteriemi, mikroskopickými houbami, prachem a kouřem. HEPA filtry jsou děleny dle stoupající účinnosti na třídy H10–H17. Struktura i funkce HEPA filtrů se liší od filtrů membránových, které zachytávají částice o konkrétní velikosti, zatímco ostatní částice filtrem procházejí. HEPA filtry jsou tvořeny náhodně uspořádanými skleněnými vlákny o průměru 0,5–2,0 μm [39].

HEPA filtry regulují počet částic dostávajících se do čistého prostředí a fungují na základě kombinace tří velmi důležitých aspektů. Zaprvé, na povrchu může být jeden nebo více vnějších filtrů, které fungují na základě prosévání, což je jeden ze základních mechanismů filtrace, který byl výše popsán. Tyto vnější filtry zachytávají větší částice, jako špínu, prach či vlasy. Uvnitř filtrů je útvar ve tvaru harmoniky, který je tvořen hustou sítí vláken a zachycuje částice o menších velikostech. Popsané filtry jsou navrženy tak, aby vyfiltrovaly 90 % částic vyskytujících se ve filtrovaném vzduchu. Vnitřní část filtru poté využívá již popsané tři základní mechanismy pro zachycení částic – difúzi, setrvačnost a intercepci. Při vysokých rychlostech vzduchu některé částice narážejí přímo do vláken (intercepce), zatímco jiné mohou být strhávány na vlákna přímo proudícím vzduchem (setrvačnost). Při nižších rychlostech vzduchu se částice pohybují Brownovým pohybem a náhodně narážejí do jednotlivých vláken (difúze). Využití všech základních mechanismů filtrace dohromady umožňuje HEPA filtrům vychytávat jak menší, tak i větší částice, než je konkrétní cílová velikost [40].



Obrázek 2: Struktura HEPA filtru a ilustrace zachycení částic intercepcí, setrvačností a difúzí [41].

HEPA filtry jsou schopné filtrovat částice o velikosti 0,3 µm minimálně s 99,97% účinností. To znamená, že filtr je schopen zachytávat částice větší než 0,3 µm s více než 99,97% účinností. Znamená to také, že účinnost filtrace je vyšší pro částice menší než 0,3 µm – čím menší částice je, tím efektivnější je HEPA filtr [42].



Obrázek 3: Závislost účinnosti filtru na průměru částice a ilustrace konkrétních mechanismů filtrace [41].

4 METODIKA

4.1 Aseptické laboratorní techniky

Mikroorganismy jsou všude kolem nás – ve vzduchu, v půdě, v prachu, ve vodě, osidlují lidský organismus a jsou přítomné také na površích běžně užívaných předmětů a na laboratorních pomůckách. Přítomnost mikrobů na zmíněných místech může být zdrojem kontaminace při práci v laboratoři. Riziko kontaminace mikroorganismy musí být během laboratorní práce sníženo na minimum, a to kvůli tomu, aby bylo dosaženo co nejpřesnějšího výsledku. Pro zajištění aseptických podmínek práce je důležitou podmínkou příprava sterilního pracovního místa. Během práce musí být zajištěno, že již sterilní předměty nebudou přicházet do kontaktu s předměty nesterilními. Existuje mnoho technik pro zajištění aseptického prostředí – desinfekce pracovních ploch a desinfekce a sterilizace užívaných předmětů či užívání pomůcek jednorázových, sterilně balených, dále využití germicidní složky UV záření a práce v laminárním boxu. Rovněž by mělo být zamezeno přílišnému dýchání na pracovní a zkoumaný materiál [43; 44; 45].

4.1.1 Laminární box

Laminární box poskytuje aseptické podmínky při práci v mikrobiologické laboratoři. Dle tříd se dělí na třídu I, II a III. Laminární box zajišťuje ochranu pracovního prostředí před prachem a dalšími kontaminanty, které mohou být ve vzduchu přítomné a mohly by ovlivnit výsledek mikrobiologického vyšetření. Pracovní prostředí je chráněno neustálým prouděním vzduchu, který je filtrován HEPA filtrem. Vzduch může v laminárním boxu proudit jak horizontálně, tak vertikálně. Horizontální proudění poskytuje značnou ochranu dané kultury, zatímco proudění vertikální poskytuje ochranu jak pro kulturu, tak pro obsluhující personál [46].

4.2 Odběr vzorků – metoda s použitím stěrových tamponů

Obecně je při odběru vzorků nutné zvolit takový způsob, který vede k vyšší pravděpodobnosti záchytu mikroorganismů. Aby bylo možné sledovat vývoj výsledků, je nutné zachovat jeden vzorkovací postup v průběhu testování daných materiálů. Odběr vzorku souvisí také se vzorkovanou plochou, která by měla být, pokud možno co největší. Čím větší vzorkovací plocha bude, tím bude vyšší pravděpodobnost záchytu mikroorganismů [47].

Norma ISO 18593 udává, že se při odběru vzorků pro mikrobiologickou analýzu může využívat sterilních stěrových tamponů. Jedná se o tyčinky se syntetickým materiálem či s vatou na jednom z jejich konců. Sterilní stěrový tampon musí být uzavřen ve zkumavce či ve sterilním obalu. Stěrové tampony se díky svému tvaru využívají nejčastěji při odběru vzorků ze špatně přístupných míst. Tato technika je proto velmi vhodná při odběru vzorků ze vzduchových filtrů, jejichž stavba připomíná harmoniku. Pro správnou kvantifikaci by měla být přibližně známa plocha odběru. Během odběru mohou být použity jak tampony vlhčené, tak tampony suché [47].

Při použití suchého stěrového tamponu se tampon pouze vyjme ze sterilního obalu či ze zkumavky. Vyňatý tampon se přiloží na vyšetřovanou plochu a stíráním vymezené plochy je odebrán vzorek. Během stírání je nutné stěrový tampon jemně otáčet za pomoci palce a ukazováčku. Při vzorkování ploch rovných je nutno stírat jak vertikálně, tak horizontálně. Při vzorkování z těžko přístupných ploch je stírání prováděno dle dostupných možností. Stěrový tampon je následně uložen zpět do zkumavky, která musí zůstat uzavřena, dokud nepokračuje testování. Doba mezi vzorkováním a následným testováním by však měla být co možná nejkratší [47].

Při využití techniky vzorkování pomocí stěrových tamponů je možné výsledky kvantitativně vyjádřit ze vzorce:

$$N_S = \frac{N \cdot F}{A} \quad (1)$$

N – počet kolonie formujících jednotek (CFU) v 1 ml ředícího roztoku

F – objem ředícího roztoku ve zkumavce v ml

A – vzorkovaný povrch v cm^2 [47]

4.3 Kultivace přítomných agens

Kultivace patří mezi přímé metody průkazu bakterií a tvoří základní kámen mikrobiologické diagnostiky. Pro správnou kultivaci je však nutné vybrat vhodné kultivační médium, které je nutné správně naočkovat. Během kultivace je důležité mikroorganismům zajistit ideální podmínky pro pomnožení. Mezi tyto podmínky patří – zajištění dostatku vody, zdrojů energie, optimální teplota a pH, ochrana před zářením a sterilita. Sterilita je rozuměna jako nepřítomnost jiných mikroorganismů na živných půdách, neboť jejich přítomnost by mohla zpomalit či úplně zastavit růst hledaných mikroorganismů. Veškeré kultivační půdy musí proto být připravovány za aseptických podmínek. Všechny vyjmenované podmínky jsou splněny při kultivaci mikroorganismů na kultivačních půdách, které inkubujeme v termostatu [48].

4.3.1 Kultivační půdy

Kultivační půdy jsou děleny na základě složení, konzistence a účelu. Dle složení dělíme půdy na přirozené a syntetické. Základ přirozených půd tvoří živný bujon. Bujon není chemicky definován, čímž se liší od půd syntetických, jejichž složení je chemicky přesně definováno. Dle konzistence jsou rozeznávány půdy tekuté a pevné. Půdy pevné jsou tvořeny ztužením nejčastěji bujonového základu za přidání 1–2 % či maximálně 5 % agaru. Dále dle účelu jsou

rozeznávány půdy základní, obohacené, diagnostické, selektivní a selektivně diagnostické. Pro účely bakalářské práce byly využívány půdy pevné a přirozené. Co se týče účelu, byly využívány půdy obohacené (krevní agar), selektivně diagnostické (Endova půda) a půdy k antibiotickým zkouškám (Mueller-Hinton agar). Pevné půdy umožňují pěstování izolovaných bakteriálních kolonií, které jsou tvořeny množstvím bakteriálních buněk a mohou vznikat i pouze z jedné přítomné bakterie. Následným rozočkováním, za použití sterilní kličky, je možné získat čisté izolované kolonie dané bakterie. Kolonie konkrétních bakterií se na jednotlivých půdách od sebe vzájemně liší a je u nich sledováno deset základních znaků, mezi které patří například velikost, tvar, okraje či barva. Tyto odlišnosti usnadňují diagnostiku daných bakterií [48].

- **Krevní agar**

Krevní agar je nejpoužívanější půdou v mikrobiologii. Jedná se o půdu obohacenou, což v tomto případě znamená, že k agarovému základu je přidáno zhruba 5–7 % defibrinované ovčí krve. Agarový základ je možné dále obohacovat různými příměsemi, dle nároků kultivovaných bakterií. Na krevním agaru roste valná většina bakterií a jeho výhodou je možnost sledovat hemolytické vlastnosti kultivovaných bakterií [48].

- **Endova půda**

Endova půda patří mezi půdy selektivně diagnostické. Její selektivita spočívá v tom, že na ní rostou pouze gramnegativní tyčinky, zejména enterobakterie. Selektivita je zajištěna bazickým fuchsinem, který inhibuje růst ostatních bakterií. Jako diagnostická se Endova půda považuje zejména díky přítomnosti laktosy. Jakmile bakterie přítomnou laktosu štěpí, rostou v intenzivně červených koloniích [48].

- **Mueller-Hinton agar**

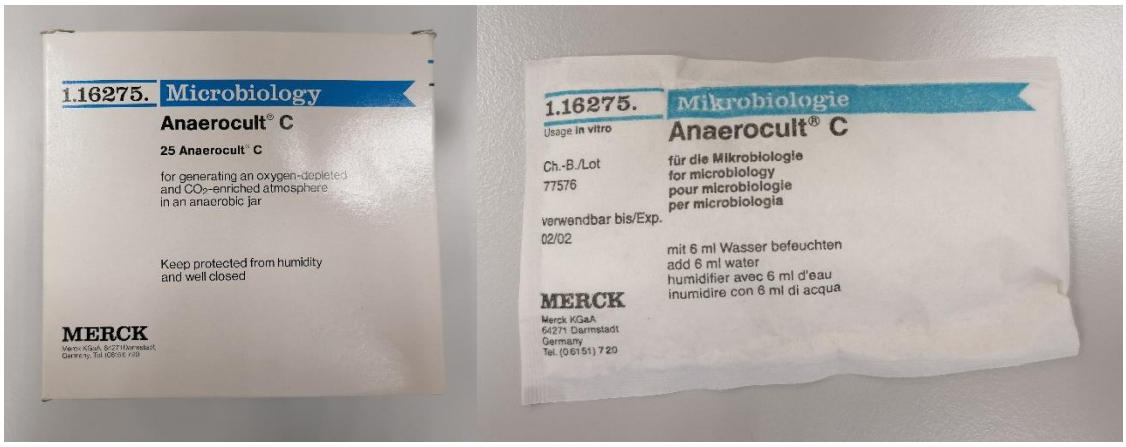
Mueller-Hinton agar je v klinické mikrobiologii společně s krevním agarem a Endovou půdou nejčastěji používaným agarem. Využívá se zejména při zjišťování citlivosti či rezistence k antibiotikům. Od základního živného agaru ho odlišuje absence peptonu a škrobu. MH agar může být pro některé účely i obohacen krví [48].

4.3.2 Termostat

Klinicky významné lidské patogeny je vhodné kultivovat při 36±1 °C. Udržení této teploty umožňují termostaty, které jsou nedílnou součástí procesu kultivace bakterií. Definovaná teplota je udržována díky elektrickému vyhřívání. V termostatu je nutno udržovat vlhké prostředí, aby nedocházelo k vysychání kultivačních půd [48].

4.3.3 Anaerobní kultivace a anaerostat

K anaerobní kultivaci se využívá uzavíratelný anaerostat, do kterého se vkládá generátor plynů, například komerčně běžně dostupný Anaerocult® C od firmy Merck. Úkolem generátoru plynů je zajistit anaerobní atmosféru, tedy atmosféru bohatou na oxid uhličitý. V anaerostatu by mělo být za přítomnosti Anaerocult® C dosaženo přítomnosti zhruba 8–10 % oxidu uhličitého a 5–7 % kyslíku. Anaerocult® C musí být nejprve navlhčen přesně 6 ml vody. Přidání vody zajistí vazbu přítomného kyslíku na železitý prášek, zároveň dochází ke vzniku oxidu uhličitého ze směsi přítomného uhličitanu sodného a kyseliny vinné či citronové. Takto navlhčený generátor plynů musí být následně velmi rychle vložen do anaerostatu, který je poté okamžitě uzavřen a vložen do termostatu [48; 49].



Obrázek 4: Originální balení a generátor plynů Anaerocult® C od firmy Merck (Natálie Klusová, 2021).

Obrázek 5: Uzavřený anaerostat s půdami a s vloženým generátorem plynů Anaerocult® C (Natálie Klusová 2021).

4.4 Gramovo barvení

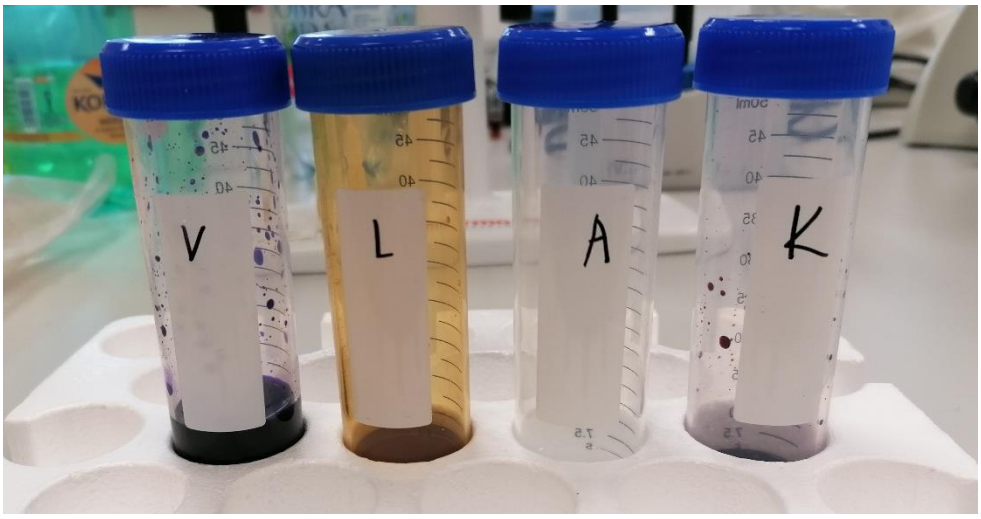
Pomocí Gramova barvení jsou o bakteriích získávány základní informace jako je velikost či tvar, hlavním důvodem využití barvení dle Grama je však rozlišení bakterií grampozitivních a gramnegativních. Ne vždy je možné rozlišit bakterie pouze na grampozitiní a gramnegativní, jelikož existují také bakterie

gramlabilní, nebarvitelné dle Grama (acidorezistetní tyčinky) či bakterie dle Grama špatně barvitelné (*Treponema pallidum*) [48].

Gramovo barvení odráží mnohé vlastnosti barvených bakterií, jako je morfologie, velikost či tvar. Základním rozdílem mezi bakteriemi grampozitivními a gramnegativními je stavba bakteriální stěny. Během barvení se v prvním kroku využívá krystalová violeť a následně je přidán Lugolův roztok. Tyto dvě látky spolu vytváří v bakteriální stěně fialově zbarvený komplex. V následujícím kroku je použit aceton, který u gramnegativních bakterií prostupuje bakteriální stěnou a způsobuje vyplavení fialového komplexu z bakteriální stěny. U bakterií grampozitivních k tomuto naopak nedochází. Posledním krokem Gramova barvení je přidání karbolfuchsinu, který je růžově zbarven. U gramnegativních bakterií proniká bakteriální stěnou a nahrazuje vyplavený fialový komplex. Z popisu vyplývá, že při následné mikroskopii by měly být gramnegativní bakterie obarveny na růžovo, zatímco bakterie grampozitivní budou obarveny na fialovo. Před samotným barvením nejprve musíme sterilní kličkou odebrat část bakteriální kolonie, kterou resuspendujeme na podložním sklíčku v kapce fyzilogického roztoku, čímž vytvoříme homogenní suspenzi. Po zaschnutí je preparát fixován plamenem a následně je barven [48].

Tabulka 1: Postup Gramova barvení (Natálie Klusová, 2021).

Barvivo	Čas působení [s]
Krystalová violeť	60–120
Lugolův roztok	60
Aceton	15
Karbolfuchsin	60



Obrázek 6: Ilustrativní fotografie postupu Gramova barvení (Natálie Klusová, 2021).

4.5 Imerzní mikroskopie

Preparáty pro imerzní mikroskopii je možné prohlížet pod optickým (světelným) mikroskopem. Přidáním imerzního oleje je vytvořeno imerzní prostředí, které disponuje stejným indexem lomu jako krycí sklíčko. Paprsky, které přecházejí do imerzního prostředí nemění svůj směr a podílejí se na tvorbě obrazu [50].

4.6 Kvantifikace počtu bakterií

Stanovit počet bakterií je možné metodou přímou a metodou nepřímou. Metoda přímá využívá mikroskopu a počet buněk ve vzorku je spočítán bez předešlé kultivace. Plotnová metoda kultivace je metodou nepřímou. U této metody dochází ke kultivaci části vzorku a dle vzniklých kolonií zjistíme počet životaschopných buněk – předpokládá se, že každá životaschopná buňka vytvoří jednu kolonii. Využívanou jednotkou je CFU/ml, neboli *„colony forming units"*. Jedná se o počet životaschopných buněk v 1 ml média či vzorku [50].

Vzorec pro výpočet CFU/ml:

$$CFU/ml = \frac{počet\ kolonií}{10^x \cdot objem\ naočkovaný} \quad (2)$$

10^x…….míra ředění

Vzorec pro výpočet počtu CFU na plochu filtru (CFU/ml/cm²):

$$CFU/ml/cm^2 = \frac{CFU \cdot 1\ ml}{plocha\ filtru} \quad (3)$$

4.7 Proteomická studie, MALDI Biotyper® system

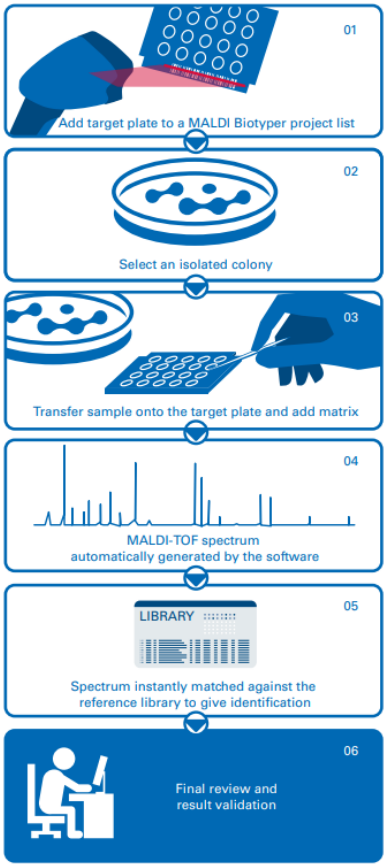
MALDI Biotyper® System (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) od firmy Bruker je založen na technologii MALDI TOF, která umožňuje velmi citlivou identifikaci řady gramnegativních a grampozitivních bakterií či kvasinek nebo plísní. Technologie MALDI TOF, neboli *„Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Fligh"*, funguje na principu hmotnostní spektrometrie. Hmotnostní spektrometrie se využívá pro identifikaci neznámých složek ve vzorku, ale může být také využita pro kvantifikaci vzorků o známém složení. Identifikace touto metodou je založena na ionizaci molekul, které jsou následně tříděny na základě poměru hmotnost/náboj [51; 52; 53].

Ionizace MALDI je měkká ionizační technika, která umožňuje ionizaci a vypařování velkých netěkavých biomolekul, jako jsou proteiny. Každý hmotnostní spektrometr MALDI-TOF je tvořen třemi základními jednotkami. První částí je iontový zdroj, který zajišťuje ionizaci vzorku a přeměňuje ho do plynné fáze. Druhou částí je hmotnostní analyzátor, který zajišťuje separaci iontů na základě poměru m/z (hmotnost/náboj). Poslední částí je vyhodnocovací zařízení, na které se dostávají malé ionty rychleji než ionty velké a je detekován

„*Time of Flight*" (čas průletu detektorem), který je závislý na hmostnosi a náboji jednotlivých částic [52; 53].

MALDI Biotyper® System měří hojně zastoupené proteiny, které se nacházejí ve všech mikroorganismech. K identifikaci jednotlivých mikroorganismů se využívá odlišností ve struktuře těchto hojně zastoupených proteinů. Příslušná struktura je porovnána s rozsáhlou knihovnou referenčních struktur a je určen konkrétní mikroorganismus [53].

MALDI Biotyper® System je velmi efektivní, jeho obsluha je snadná a analýza probíhá v několika málo jednoduchých krocích. Před analýzou není nutno vědět, zda je daný mikroorganismus bakterie, kvasinka či plíseň, jelikož veškerá identifikace probíhá na stejném principu. K analýze je potřeba jedna čistá kolonie mikroorganismu a výsledek je znám během několika minut, analýza tedy probíhá v reálném čase. Software automaticky generuje hmostnosní spektrum, které je následně okamžitě porovnáno s referenčními hodnotami, díky čemuž dochází k identifikaci mikroorganismů a výsledek z daného měření má podobu vykreslených hmotnostních spekter a vyjmenovaných mikroorganismů s nejvyšší shodou s referenčním materiálem. Pokud se mikroorganismus povede identifikovat, je u něj uvedena hodnota „*Score Value*", která musí být u spolehlivé analýzy vyšší než 2,0 [53].



Obrázek 7: Ilustrace postupu při analýze MALDI Biotyper® system [53].

4.8 Multiplex PCR

PCR, neboli polymerázová řetězová reakce je metoda molekulární biologie, která umožňuje získat konkrétní sekvenci genomové DNA bez nutnosti jejího předchozího klonování ve vektorech. PCR reakce je založena na replikaci DNA. Jedná se o enzymovou syntézu nových řetězců vybraných úseků DNA, která je složena ze tří navazujících a cyklicky se opakujících kroků. Enzym, který zajišťuje syntézu komplementárních vláken dle templátu, se nazývá DNA polymeráza. Syntéza prostřednictvím tohoto enzymu probíhá ve směru 5‘–3‘. Konkrétní úsek, který má být replikován je vymezen pomocí dvou primerů. Připojení primerů předchází denaturace molekuly DNA, při které vznikají dvě jednořetězcové molekuly, na které dosedají primery a poskytují DNA polymeráze požadovaný 5‘ úsek, na jehož 3‘ konec DNA polymeráza

syntetizuje nové vlákno DNA. V reakční směsi je nutná přítomnost nukleotidů, které DNA polymeráza využívá pro syntézu komplementárních řetězců. Během reakce dochází k poměrně velkým změnám teplot v krátkých časových intervalech, proto se využívají termostabilní DNA polymerázy, mezi které patří například *Taq* DNA polymeráza. Tato DNA polymeráza je izolována z termofilních mikroorganismů *Thermus aquaticus* a odolává vysokým teplotám, které jsou nutné pro denaturaci DNA [54].

Jednotlivé cykly PCR:

- denaturace dvoušroubovic DNA (94 °C);
- nasednutí primerů k jednořetězcovým molekulám DNA (30–60 °C);
- syntéza komplementárních řetězců DNA prostřednictvím DNA polymerázy (65–75 °C) [54].

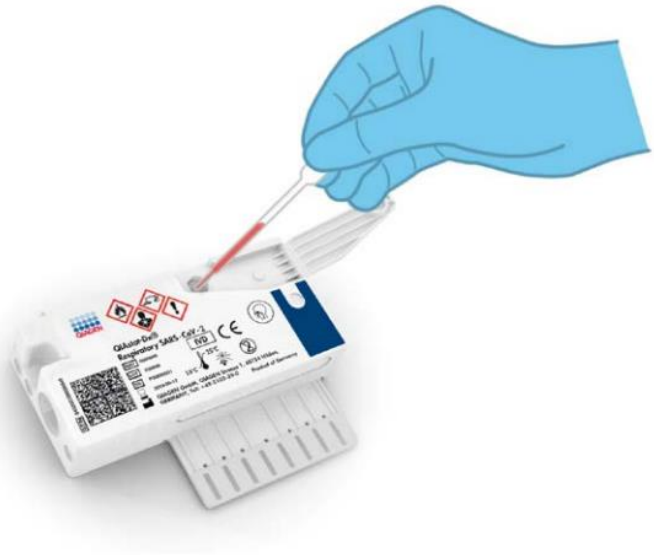
Multiplex PCR se od výše popsané PCR rekce liší tím, že je do reakční směsi přidáno několik párů primerů. Tyto odlišné primery rozpoznávají několik různých typů cílových sekvencí a umožňují proto současnou detekci několika genů v jedné reakční směsi [54].

Multiplex PCR může probíhat formou tzv. *„real-time PCR"*, tato metoda umožňuje kvantifikaci produktu v reálném čase. Real-time PCR probíhá ve specializovaném termocycleru, který zajišťuje nejen rychlé změny teplot nutné pro průběh reakce, ale také detekci fluorescence během reakce, čímž je během každého cyklu zaznamenáváno množství produktu formou amplifikační křivky. Proto není nutné po skončení reakce provádět elektroforézu. Během reakce jsou využívány krátké oligonukleotidy, které na jednom ze svých konců nesou tzv. zhášeč a na druhém fluorescenční sondu. Tyto oligonukleotidy dosedají na templátové vlákno DNA. Dokud je zhášeč v blízkosti sondy, není detekována

fluorescence. Jakmile se však dostane do blízkosti oligonukleotidu DNA polymeráza, dochází k uvolnění oligonukleotidu a k oddělení zhášeče od sondy a je detekována fluorescence. Pro značení hybridizačních sond a primerů jsou využívány fluorofory [54].

Pro práci byl využit QIAstat-Dx Analyzer 1.0 a vzorek byl testován na Respiračním panelu QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2. Tento panel je kvalitativním testem, díky kterému je možné identifikovat přítomnost virových či bakteriálních nukleových kyselin. Panel umožňuje práci s prostými stěry, ale také s tekutými alikvoty v přepravním mediu. Při práci byla zvolena práce s tekutými alikvoty, které byly připraveny následně:

I. Provedení stěru vzduchového filtru suchým tamponem.
II. Ponoření stěrového tamponu do 1 ml fyziologického roztoku.
III. Protřepání na vysokofrekvenční třepačce (vortex).
IV. Přenos 200 µl tekutého alikvotu do kazety [55].



Obrázek 8: Ilustrace přenosu tekutého alikvotu do kazety [55].

Analýza probíhá jako multiplex PCR v reálném čase. Respirační panel detekuje celkem 22 různých patogenů a využívá kazetu QIAstat-Dx Respiratory

SARS-CoV-2 Panel Cartridge. Jedná se o jednorázové plastové zařízení, ve kterém probíhají veškeré kroky přípravy alikvotů a testování. Veškerá činidla potřebná pro úplné zpracování testu jsou obsažena v kazetě.

Analýza probíhá automaticky v následujících krocích:

- Interní kontrola je resuspednována.
- Chemická či mechanická lýza buněk.
- Purifikace nukleových kyselin.
- Smíchání lyofilizovaných činidel s purifikovanými nukleovými kyselinami.
- Přenos daných alikvotů eluátu do reakčních komor.
- Analýza multiplex PCR v reálném čase v každé reakční komoře [55].

Obrázek 9: Fotografie kazety QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel Cartridge (Natálie Klusová, 2021).

Tabulka 2: Detekované patogeny respiračním panelem QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 (dle [55]).

Patogen	Klasifikace patogenu
Influenza A	Orthomyxovirus (RNA)
Influenza A (subtyp H1N1/2009)	
Influenza A (subtyp H1)	
Influenza A (subtyp H3)	
Influenza B	
Coronavirus 229E	Coronavirus (RNA)
Coronavirus HKU1	
Coronavirus NL63	
Coronavirus OC43	
SARS-CoV-2	
Parainfluenza virus 1	Paramyxovirus (RNA)
Parainfluenza virus 2	
Parainfluenza virus 3	
Parainfluenza virus 4	
Respirační syncytiální virus A/B	
Lidský Metapneumovirus A/B	
Adenovirus	Adenovirus (DNA)
Bocavirus	Parvovirus (DNA)
Rhinovirus/Enterovirus	Picornavirus (RNA)
Mycoplasma pneumoniae	Bakterie (DNA)
Legionella pneumophilla	
Bordetella pertusis	

5 VÝSLEDKY

V praktické části práce byly mikrobiologicky vyšetřeny vzorky z celkem 21 vzduchových filtrů, které byly za aseptických podmínek vyňaty při běžných pravidelných údržbách osobních automobilů po jednom roce provozu nebo ujetých 20 000 km. Z filtrů byly odebrány vzorky, které byly aerobně a anaerobně kultivovány, barveny dle Grama, mikroskopicky prohlédnuty a vzorky ze dvou vybraných filtrů byly podrobeny proteomické studii. Vzorek z filtru 22 byl také vyšetřen pomocí multiplex PCR. Z vyšetřených 21 filtrů bylo vybráno 6 reprezentativních zástupců, kterým se praktická část bakalářské práce věnuje.

Vzduchové filtry nemají jednu předepsanou velikost, ale dle typu automobilu mohou být tvarově různé, proto je nutné z důvodu kvantifikace nalezených mikroorganismů znát plochu jednotlivých filtrů.

Tabulka 3: Plochy vybraných filtrů.

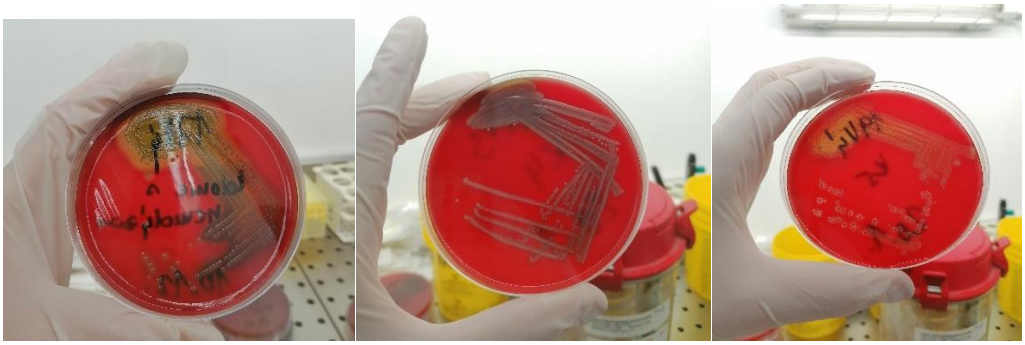
Filtr číslo	Výška (cm)	Šířka (cm)	Plocha (cm^2)
11	50	10	500
16	24	19,5	468
17	23	20,5	471,5
19	25	20	500
20	25	20	500
21	25	20	500

5.1 Odběr vzorků a kultivace

Vzorky ze všech filtrů byly odebírány suchým stěrovým tamponem polyesterového typu a byl dodržen postup pro odběr vzorků dle normy ISO 18593. Odběr byl proveden vždy na vstupní i na výstupní straně filtru, přičemž byly dodrženy aseptické podmínky práce, která vždy probíhala v laminárním boxu. Následně bylo stěrovým tamponem vytvořeno inokulum na kultivační půdě a pomocí sterilní kličky došlo k rozočkování. První kultivace

probíhala vždy na krevním agaru a Mueller-Hinton agaru pro vzorky ze vstupní i výstupní plochy vzduchového filtru. V průběhu zkoumání byla využita rovněž Endova půda a Mueller-Hinton půda s příměsí krve. Kultivace byly prováděny při 36±1 °C v termostatu po dobu 24–72 hodin. Byla provedena také kultivace v anaerostatu za přítomnosti generátoru plynů Anaerocult® C, kultivace však nepotvrdila přítomnost anaerobních bakterií.

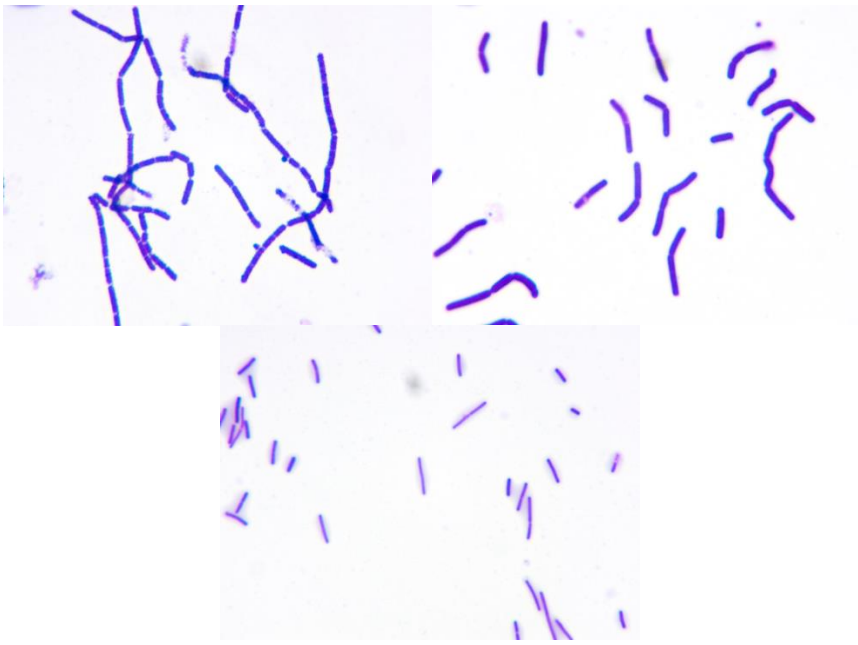
Kolonie byly nalezeny na krevním agaru, na Mueller-Hinton agaru a na Mueller-Hinton agaru s příměsí krve. Byly identifikovány zejména bakterie rodu *Bacillus*, které se běžně vyskytují ve vzduchu, prachu a půdě.



Obrázek 10: Bacillus cereus (vlevo), Bacillus subtilis (uprostřed), Bacillus licheniformis (vpravo) (Natálie Klusová, 2021).

5.2 Gramovo barvení

Po kultivaci bylo u vybraných kolonií provedeno Gramovo barvení pro rozlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií a pro celkovou identifikaci. Gramovo barvení bylo prováděno dle tabulky 1 (viz kapitola 4.4) a byl dodržen doporučený postup barvení. Obarvené vzorky byly následně pozorovány pod mikroskopem LABOMED Lx 400 za použití imerzního oleje. Barvení získaných kolonií z vybraných filtrů potvrdilo přítomnost zejména bakterií rodu *Bacillus*, konkrétně druhů *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis*. Vypsané druhy jsou bakterie grampozitivní.



Obrázek 11: Gramovo barvení – Bacillus cereus (vlevo nahoře), Bacillus subtilis (vpravo nahoře), Bacillus licheniformis (dole) (Daniela Obitková, Natálie Klusová, 2021).

5.3 Kvantifikace zachycených bakterií

Kvantifikace bakterií zachycených na výstupních a vstupních plochách filtrů byla provedena dle normy ISO 18593. Jako vzorkovací roztok byl použit sterilní fyziologický roztok o objemu 1 ml. Tento objem byl použit z důvodu předpokladu malého množství mikroorganismů potenciálně přítomných na ploše filtru. Pro výpočet byl využit vzorec (1) (viz kapitola 4.2). Získané výsledky jsou vyjádřeny jednotkou CFU/ml/cm^2.

Ukázka dosazení do vzorce (1):

$$N_S = \frac{1 \cdot 1}{500} = 0{,}002\ CFU/ml/cm^2$$

Hodnota N, která je vyjádřena jednotkou CFU/ml byla dopočítána dle vzorce (2) (viz kapitola 4.6).

Ukázka dosazení do vzorce (2):

$$N = \frac{1}{10^1 \cdot 0{,}1} = 1\ CFU/ml$$

Tabulka 4: Počty konkrétních bakteriálních kolonií kultivovaných ze stěrů vstupní a výstupní plochy filtru 11 a dopočítané kvantifikace na plochu filtru.

	CFU v 1 ml – vstupní strana	Ns (CFU/ml/cm²) –vstupní strana	CFU v 1 ml – výstupní strana	Ns (CFU/ml/cm²) –výstupní strana
Bacillus cereus	6	0,012	0	0
Bacillus subtilis	1	0,002	1	0,002
Bacillus licheniformis	6	0,012	0	0

Tabulka 5: Počty konkrétních bakteriálních kolonií kultivovaných ze stěrů vstupní a výstupní plochy filtru 16 a dopočítané kvantifikace na plochu filtru.

	CFU v 1 ml – vstupní strana	Ns (CFU/ml/cm²) –vstupní strana	CFU v 1 ml – výstupní strana	Ns (CFU/ml/cm²) –výstupní strana
Bacillus cereus	2	0,004	0	0
Bacillus subtilis	3	0,006	1	0,002
Bacillus licheniformis	2	0,004	2	0,004

Tabulka 6: Počty konkrétních bakteriálních kolonií kultivovaných ze stěrů vstupní a výstupní plochy filtru 17 a dopočítané kvantifikace na plochu filtru.

	CFU v 1 ml – vstupní strana	Ns (CFU/ml/cm²) – vstupní strana	CFU v 1 ml – výstupní strana	Ns (CFU/ml/cm²) – výstupní strana
Bacillus cereus	2	0,004	1	0,002
Bacillus subtilis	4	0,008	0	0
Bacillus licheniformis	5	0,011	0	0

Tabulka 7: Počty konkrétních bakteriálních kolonií kultivovaných ze stěrů vstupní a výstupní plochy filtru 19 a dopočítané kvantifikace na plochu filtru.

	CFU v 1 ml – vstupní strana	Ns (CFU/ml/cm²) – vstupní strana	CFU v 1 ml – výstupní strana	Ns (CFU/ml/cm²) – výstupní strana
Bacillus cereus	11	0,022	1	0,002
Bacillus subtilis	5	0,010	3	0,006
Bacillus licheniformis	16	0,032	3	0,006

Tabulka 8: Počty konkrétních bakteriálních kolonií kultivovaných ze stěrů vstupní a výstupní plochy filtru 20 a dopočítané kvantifikace na plochu filtru.

	CFU v 1 ml – vstupní strana	Ns (CFU/ml/cm²) – vstupní strana	CFU v 1 ml – výstupní strana	Ns (CFU/ml/cm²) – výstupní strana
Bacillus cereus	3	0,006	1	0,002
Bacillus subtilis	5	0,010	1	0,002
Bacillus licheniformis	9	0,018	2	0,004

Tabulka 9: Počty konkrétních bakteriálních kolonií kultivovaných ze stěrů vstupní a výstupní plochy filtru 21 a dopočítané kvantifikace na plochu filtru.

	CFU v 1 ml – vstupní strana	Ns (CFU/ml/cm²) – vstupní strana	CFU v 1 ml – výstupní strana	Ns (CFU/ml/cm²) – výstupní strana
Bacillus cereus	2	0,004	0	0
Bacillus subtilis	4	0,008	0	0

5.4 Vyjádření účinnosti jednotlivých filtrů v procentech

Pomocí přímé úměry bylo možné ze získaných dat dopočítat procentuální záchyt a průchodnost jednotlivých bakterií na vybraných filtrech. Následně bylo možné dopočítat celkový procentuální záchyt a průchodnost daného filtru vztažený na počet všech kultivovaných bakteriálních kolonií.

Tabulka 10: Dílčí a celkový záchyt kultivovaných bakterií na filtru 11.

	Záchyt (%)	Průchodnost (%)
Bacillus cereus	100	0
Bacillus subtilis	0	100
Bacillus licheniformis	100	0
Celkem	92,3	7,7

Tabulka 11: Dílčí a celkový záchyt kultivovaných bakterií na filtru 16.

	Záchyt (%)	Průchodnost (%)
Bacillus cereus	100	0
Bacillus subtilis	66,7	33,3
Bacillus licheniformis	0	100
Celkem	57,1	42,9

Tabulka 12: Dílčí a celkový záchyt kultivovaných bakterií na filtru 17.

	Záchyt (%)	Průchod (%)
Bacillus cereus	50	50
Bacillus subtilis	100	0
Bacillus licheniformis	100	0
Celkem	91,3	8,7

Tabulka 13: Dílčí a celkový záchyt kultivovaných bakterií na filtru 19.

	Záchyt (%)	Průchodnost (%)
Bacillus cereus	90,9	9,1
Bacillus subtilis	40,0	60,0
Bacillus licheniformis	81,2	18,8
Celkem	78,1	21,9

Tabulka 14: Dílčí a celkový záchyt kultivovaných bakterií na filtru 20.

	Záchyt (%)	Průchodnost (%)
Bacillus cereus	66,7	33,3
Bacillus subtilis	80,0	20,0
Bacillus licheniformis	77,8	22,2
Celkem	79,4	20,6

Tabulka 15: Dílčí a celkový záchyt kultivovaných bakterií na filtru 21.

	Záchyt (%)	Průchodnost (%)
Bacillus cereus	100	0
Bacillus subtilis	100	0
Celkem	100	0

5.5 MALDI Biotyper® System

Vybrané kolonie získané kultivací suchých stěrů z filtrů 16 a 17 byly analyzovány technologií MALDI TOF, konkrétně přístrojem MALDI Biotyper® System od firmy Bruker. Z každé kultivační půdy byly po 24-hodinové kultivaci vybrány konkrétní čisté kolonie, které byly přeneseny na vzorkovací destičku,

kam byla přidána matrix o objemu 1 µl. Následně proběhla analýza a byly získány výsledky ve formě jednotlivých hodnot *„Score Value"*.

Tabulka 16: Výsledky z přístroje MALDI Biotyper® System a příslušné hodnoty Score value.

	Detekovaný mikroorganismus	Score value
Vstupní strana filtru 16	*Brevibacillus borstelensis*	2,54
Výstupní strana filtru 16	*Bacillus clausii*	2,03
	Bacillus subtilis	1,80
Výstupní strana filtru 17	*Bacillus fordii*	2,19

5.6 Multiplex PCR

Přestože je bakalářská práce zaměřena převážně na možnou bakteriální kontaminaci vzduchových filtrů, byla na filtru 22 provedena také analýza přítomnosti virových nukleových kyselin prostřednictvím multiplex PCR. Multiplex PCR bylo provedeno na QIAstat-Dx Analyzer 1.0. Pro testování byl využit respirační panel QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2, který umožňuje práci se suchými stěry. Analýza byla provedena následovně:

I. Odběr vzorku ze vstupní/výstupní plochy filtru suchým stěrovým tamponem.
II. Vložení suchého stěrového tamponu do zkumavky s 1 ml fyziologického roztoku.
III. Promíchání vzorku a odstranění použitého stěrového tamponu ze zkumavky.
IV. Přenesení 200 µl získaného tekutého vzorku do měřící kazety.
V. Vložení kazety do přístroje QIAstat-Dx Analyzer 1.0 a zahájení měření.

Pomocí respiračního panelu byla zjišťována potenciální přítomnost celkem 22 patogenů (19 patogenů virového původu a 3 původu bakteriálního), z čehož žádný nebyl přítomen na vstupní ani na výstupní straně filtru číslo 22.

QIAstat-Dx® Respiratory SARS-CoV-2 Panel www.qiagen.com

TEST REPORT

Patient ID p **Sample ID** 22vystup **Test Time** 08-02-2021 16:27

NO PATHOGEN DETECTED

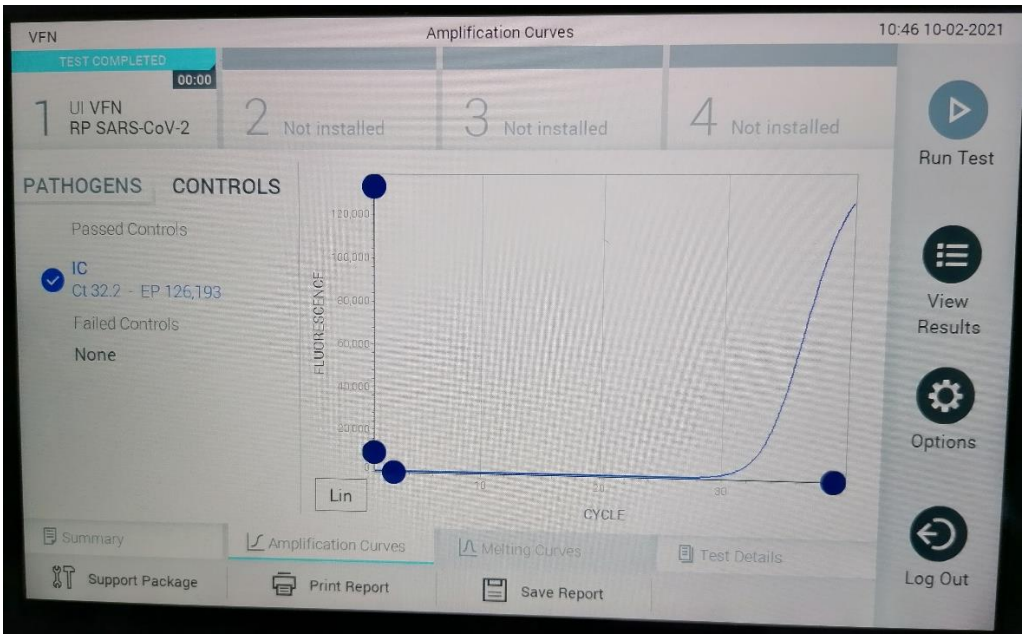
User VFN **Test Status** Completed **Internal Controls** Passed

RESULT DETAILS			Ct / EP
Viruses	Not detected	Adenovirus	– / –
	Not detected	Bocavirus	– / –
	Not detected	Coronavirus 229E	– / –
	Not detected	Coronavirus HKU1	– / –
	Not detected	Coronavirus NL63	– / –
	Not detected	Coronavirus OC43	– / –
	Not detected	Human Metapneumovirus A+B	– / –
	Not detected	Influenza A	– / –
	Not detected	Influenza A H1	– / –
	Not detected	Influenza A H1N1 pdm09	– / –
	Not detected	Influenza A H3	– / –
	Not detected	Influenza B	– / –
	Not detected	Parainfluenza virus 1	– / –
	Not detected	Parainfluenza virus 2	– / –
	Not detected	Parainfluenza virus 3	– / –
	Not detected	Parainfluenza virus 4	– / –
	Not detected	Respiratory Syncytial Virus A+B	– / –
	Not detected	Rhinovirus/Enterovirus	– / –
	Not detected	SARS-CoV-2	– / –
Bacteria	Not detected	*Bordetella pertussis*	– / –
	Not detected	*Legionella pneumophila*	– / –
	Not detected	*Mycoplasma pneumoniae*	– / –
Controls	Detected	IC	29.7 / 167,017

TEST DETAILS

Obrázek 12: Výsledek testování vzorku z výstupní strany filtru číslo 22 provedeného multiplex PCR – totožný s výsledkem vstupní strany.

Součástí každého měřícího cyklu na analyzátoru QIAstat-Dx Analyzer 1.0 je měření kontrol. Kontroly je nutné spolu s výsledky zkontrolovat – pokud jsou kontroly v pořádku, výsledky mohou být považovány za validní. Měření kontrol musí proběhnout při každém testu.



Obrázek 13: Validní kontrola zobrazená ve formě amplifikační křivky – závislost intenzity fluorescence na počtu cyklů (Natálie Klusová, 2021).

6 DISKUZE

Bakalářská práce se zabývala mikrobiální kontaminací vzduchových filtrů v automobilových kabinových klimatizacích se zaměřením zejména na kontaminaci bakteriální. Na vstupních i výstupních plochách vybraných filtrů byly nalezeny bakterie rodu *Bacillus*, konkrétně druhy *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a *Bacillus licheniformis*. Vzorky byly získány formou suchých stěrů a kultivace probíhala při 36±1 °C v termostatu. Kultivace probíhala na krevním agaru a MH agaru, které byly pro růst bakterií rodu *Bacillus* dostatečné a bakterie nebylo nutné kultivovat déle než 24 hodin. Autoři článku „*Brewing microbiology – bacteria of the genera Bacillus, Brevibacillus and Paenibacillus and cultivation methods for their detection – part 2*" došli během kultivace těchto tří bakterií ke stejnému závěru a stejně tak došli k tomu, že přestože je *Bacillus licheniformis* bakterie termofilní a uvádí se, že pro kultivaci potřebuje teplotu 50 °C, narůstá i ve výrazně nižších teplotách. V našem případě tedy bakterii stačilo pouze 36±1 °C [26].

Jako jeden z identifikačních nástrojů bylo zvoleno Gramovo barvení, které ukázalo, že zkoumané bakteriální kolonie byly grampozitivní. Bakterie rodu *Bacillus* jsou grampozitivní, některé druhy se však mohou s rostoucím stářím jevit jako gramnegativní. Barvení bylo prováděno vždy na koloniích čerstvě kultivovaných a suspektní kolonie rodu *Bacillus* byly identifikovány vždy jako grampozitivní. Gramovo barvení je v případě bakterií rodu *Bacillus* dostačující technikou [56].

Vybrané kolonie z ploch filtrů 16 a 17 byly podrobeny proteomické studii MALDI TOF. Jak ukazuje tabulka 16, na vstupní ploše filtru 16 byl technologií MALDI TOF identifikován *Brevibacillus borstelensis* a na ploše výstupní *Bacillus clausii* a *Bacillus subtilis*. Na výstupní ploše filtru 17 byl identifikován *Bacillus fordii*. Hodnoty Score value byly téměř u všech identifikovaných bakterií

vyšší než 2,0. Pro *Bacillus subtilis* hodnota dosahovala pouze 1,80. Vyjmenované bakterie doplňují informace o bakteriích identifikovaných kultivací a Gramovým barvením, které jsou uvedené v tabulkách 5 a 6. Je nutné si uvědomit, že během analýzy MALDI TOF jsou identifikovány pouze vybrané čisté kolonie, nikoliv vzorek z celé plochy filtru. Chyby při identifikaci nebo nedostatečná hodnota Score value může být u bakterií rodu *Bacillus* způsobena přítomností bakteriálních pouzder, které se problematicky rozrušují.

Při identifikaci bakterií technologií MALDI TOF je velmi důležité, aby software obsahoval rozsáhlou referenční databázi mikroorganismů. V práci byl využit MALDI Biotyper® System od firmy Bruker. Biotyper je komerční program, který je využíván zejména pro klinickou diagnostiku, proto databáze obsahuje převážně patogenní druhy bakterií, nebo bakterie s klinickým významem. Biotyper byl tedy pro naši práci vhodný [57].

Přítomnost *Brevibacillus borstelensis*, *Bacillus clausii* a *Bacillus fordii* může být vysvětlena jejich hojným výskytem v životním prostředí, který je pro rod *Bacillus* typický. *Brevibacillus borstelensis* je také znám pro své rozsáhlé klinické využití, stejně tak jako *Bacillus clausii* a *Bacillus fordii*, které jsou hojně využívány v oblasti probiotické léčby, a proto mají své místo v databázi Biotyper [58].

Filtr 22 byl vyšetřován na přítomnost virových nukleových kyselin na vzduchových filtrech prostřednictvím multiplex PCR. Z obou ploch filtru byl získán suchý stěr, který byl převeden na tekutý alikvot a byl analyzován na diagnostickém panelu QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2. Multiplex PCR neodhalila přítomnost žádného z testovaných patogenů. HEPA filtry pracují s účinností 99,97 % při filtraci částic o velikosti 0,3 μm, které jsou nejvíce penetrujícími částicemi. To znamená, že 0,03 % částic o této velikosti není filtrováno. Viry, jejichž velikost se pohybuje v řádu nanometrů, filtrem patrně

volně prochází a nemohou proto být detekovány na jeho povrchu. Dalším důvodem nepřítomnosti virových nukleových kyselin může být výskyt různých druhů DNáz a RNáz v prostředí [59].

Jak již bylo uvedeno, práce na vzduchových filtrech odhalila přítomnost bakterií *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis*, které byly přítomny na vstupních plochách všech vybraných filtrů, pouze na vstupní ani výstupní ploše filtru 21 nebyla prokázána přítomnost *Bacillus licheniformis*. Vyjmenované bakterie se poměrně hojně vyskytují zejména v půdě, prachu a vzduchu. Přesto je kontaminace filtrů během práce vyloučena, jelikož manipulace s nimi probíhala vždy v laminárním boxu za aseptických podmínek. Jejich přítomnost může být vysvětlena poměrně vysokou životaschopností za nepříznivých podmínek, kterou obecně disponují bakterie přítomné ve vzduchu, prachu či půdě [60].

B. subtilis a *B. licheniformis* jsou na rozdíl od *B. cereus* bakterie nepatogenní. *B. cereus* je klasifikován jako patogen, v některých literaturách také jako oportunní patogen. Onemocnění vyvolané *B. cereus* je nejčastěji spojeno s konzumací kontaminované potravy. Bylo však zjištěno, že pouze vybrané kmeny *B. cereus* jsou patogenní. Znamená to, že pokud bude potravina kontaminována nepatogenním kmenem, nedojde k rozvoji onemocnění. Zároveň je zde pravděpodobnost, že některé patogenní kmeny se nepřenášejí pouze kontaminovanou potravou a mohou vyvolávat nongastrointestinální obtíže. Onemocnění způsobené kolonizací sliznic cest dýchacích či ústní dutiny však ve spojitosti s touto bakterií nebylo zdokumentováno. Naše práce dokazuje, že *B. cereus* se vyskytoval na výstupních plochách poloviny vybraných filtrů – vždy však v menším množstvím než na plochách vstupních. Přestože je pravděpodobné, že se jednalo o patogenní kmeny, u zdravých jedinců by s jejich přítomností nemělo být spojeno žádné zdravotní riziko. Patogenita *B. cereus* je

ovšem také závislá na jeho schopnosti proniknout do organismu a kolonizovat ho. Toto je ovlivněno stavem imunitního systému hostitele, riziko by tedy zde mohlo existovat pro imunokompromitované jedince. Určité riziko by mohlo hrozit i v interiéru automobilu, kde není výjimkou převážení potravin či jejich konzumace. V takové situaci by mohlo dojít ke kontaminaci potravin sporami *B. cereus*, ale vzhledem k množství bakterie nalezeném na výstupních plochách filtrů je riziko mizivé [61].

Daniela Obitková a Emil Pavlík ve svém článku „*Microbial contamination of HEPA filters of household vacuum cleaners*" z roku 2021 uvádějí, že důvodem nepřítomnosti patogenních bakterií na vzduchových filtrech vysavačů může být to, že jsou využívány v jedné domácnosti, kde se vyskytují většinu času pouze členové dané domácnosti. Stejně tak může být odůvodněna nepřítomnost patogenů na vzduchových filtrech automobilových klimatizací, jelikož i zde většinu času cestují pouze členové jedné domácnosti. Výsledky by mohly být jiné, pokud bychom měli k dispozici vzduchové filtry z automobilů, ve kterých se během roku vyskytne velké množství různých osob, což by mohly být například automobily využívané pro služby autoškol či taxislužeb [36].

7 ZÁVĚR

Hlavním cílem práce byla izolace reprezentativních vzorků ze vstupních a výstupních ploch vzduchových filtrů. Vzorky byly odebrány z celkem 21 vzduchových filtrů, z nichž bylo pro práci vybráno šest zástupců. Vzorky byly kultivovány, identifikovány a identifikované bakterie byly kvantifikovány. Na vstupních stranách všech filtrů byly přítomny bakterie *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a *Bacillus licheniformis*. Pouze vstupní strana filtru 21 nedisponovala přítomností *B. licheniformis*. Výskyt minimálně jedné z vyjmenovaných bakterií byl potvrzen na výstupních plochách téměř všech filtrů. Pouze na výstupní ploše filtru 21 nebyly přítomny žádné bakterie. Zastoupení daných bakterií bylo na jednotlivých filtrech také zhodnoceno procentuálně.

Vybrané kolonie získané z filtrů 16 a 17 byly podrobeny proteomické studii MALDI TOF, která spolehlivě odhalila přítomnost bakterií *Brevibacillus brevis*, *Bacillus fordii*, *Bacillus clausii* a s hodnotou Score value 1,8 také *Bacillus subtilis*.

Nepřítomnost virových nukleových kyselin na filtrech byla potvrzena analýzou vstupní a výstupní plochy filtru 22. Analýza probíhala prostřednictvím multiplex PCR na QIAstat-Dx Analyzer 1.0.

Cílem práce byl mikrobiologický průkaz mikroorganismů na vzduchových filtrech. Cíl práce byl splněn. Závěrem práce je, že na filtrech nebyla potvrzena přítomnost patogenních bakterií ani virových nukleových kyselin, které by mohly představovat riziko pro cestující.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

MH agar	Muller-Hinton agar
PCR	Polymerázová řetězová reakce
CFU	Colony forming unit
MALDI TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight
HEPA	High Efficiency Particulate Air Filter
EPA	Efficient Air Filter
ULPA	Ultra Low Penetration Air Filter

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] KLABAN, Vladimír. *Obecná a environmentální mikrobiologie: fascinující, neuvěřitelný a tajemný svět mikrobů v přírodním prostředí*. Vydání: první. Hradec Králové: Gaudeamus, 2018. ISBN 978-80-7435-673-5.

[2] MURRAY, Patrick, Ken ROSENTHAL a Michael PFALLER. *Medical microbiology*. 8th edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-323-29956-5.

[3] SHARMA, Neetu, Sonu BHATIA, Abhinashi SINGH SODHI a Navneet BATRA. Oral microbiome and health. *AIMS Microbiology* [online]. 2018, 4(1), 42-66 [cit. 2021-5-4]. ISSN 2471-1888. Dostupné z: doi:10.3934/microbiol.2018.1.42

[4] JULÁK, Jaroslav a Emil PAVLÍK. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékařství*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1792-3.

[5] DEWHIRST, Floyd E., Tuste CHEN, Jacques IZARD, Bruce J. PASTER, Anne C. R. TANNER, Wen-Han YU, Abirami LAKSHMANAN a William G. WADE. The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology* [online]. 2010, 192(19), 5002-5017 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00542-10

[6] KLABAN, Vladimír. *Obecná a environmentální mikrobiologie*. 1. Hradec Králové: Gaudeamus, 2018, s. 380-384. ISBN 978-80-7435-673-5.

[7] JULÁK, Jaroslav a Emil PAVLÍK. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékařství*. 1. Praha: Karolinum, 2010, s. 83-86. ISBN 978-80-246-1792-3.

[8] *Orální streptokoky* [online]. Česká republika: MEFANET, 2019 [cit. 2020-11-08]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Or%C3%A1ln%C3%AD_streptokoky

[9] *Neisseria* [online]. Česká republika: MEFANET, 2018 [cit. 2020-11-08]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Neisseria

[10] JULÁK, Jaroslav a Emil PAVLÍK. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékařství*. 1. Praha: Karolinum, 2010, s. 77-95. ISBN 978-80-246-1792-3.

[11] *Staphylococcus* [online]. Česká republika: MEFANET, 2020 [cit. 2020-11-08]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Staphylococcus

[12] *Micrococcus* [online]. Česká republika: MEFANET, 2018 [cit. 2020-11-08]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Micrococcus

[13] *Micrococcus luteus* [online]. Česká republika: MEFANET, 2019 [cit. 2020-11-08]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Micrococcus_luteus

[14] KLABAN, Vladimír. *Obecná a environmentální mikrobiologie*. 1. Hradec Králové: Gaudeamus, 2018, s. 389-390. ISBN 978-80-7435-673-5.

[15] AGUILERA, Ángeles, Graciela DE DIEGO-CASTILLA, Susana OSUNA, Rafael BARDERA, Suthyvann SOR MENDI, Yolanda BLANCO a Elena GONZÁLEZ-TORIL. Microbial Ecology in the Atmosphere: The Last Extreme Environment. NAJJARI, Afef, Ameur CHERIF, Haïtham SGHAIER a Hadda IMENE OUZARI, ed. *Extremophilic Microbes and*

Metabolites - Diversity, Bioprospecting and Biotechnological Applications [online]. 1. IntechOpen, 2021, 2021-2-24, s. 1-23 [cit. 2021-5-4]. ISBN 978-1-83969-040-2. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.81650

[16] JULÁK, Jaroslav a Emil PAVLÍK. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékařství*. 1. Praha: Karolinum, 2010, s. 198-201. ISBN 978-80-246-1792-3.

[17] KLABAN, Vladimír. *Obecná a environmentální mikrobiologie*. 1. Hradec Králové: Gaudeamus, 2018, s. 98-103. ISBN 978-80-7435-673-5.

[18] GOERING, Richard V., Hazel M. DOCKRELL, Mark A. ZUCKERMAN, Ivan M. ROITT a Peter L. CHIODINI, JULÁK, Jaroslav, ed. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Přeložil Jan BOBEK, přeložil Renáta ČERMÁKOVÁ, přeložil Karel HOLADA, přeložil Zora MĚLKOVÁ, přeložil Tibor MOŠKO, přeložil Jan NOVÁK, přeložil Ludmila PROKEŠOVÁ, přeložil Jiřina SUCHANOVÁ. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.

[19] SERRA, C. R., A. M. EARL, T. M. BARBOSA, R. KOLTER a A. O. HENRIQUES. Sporulation during Growth in a Gut Isolate of Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology* [online]. 2014, 196(23), 4184-4196 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.01993-14

[20] EARL, Ashlee M., Richard LOSICK a Roberto KOLTER. Ecology and genomics of Bacillus subtilis. *Trends in Microbiology* [online]. 2008, 16(6), 269-275 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2008.03.004

[21] KLABAN, Vladimír. *Obecná a environmentální mikrobiologie*. 1. Hradec Králové: Gaudeamus, 2018, s. 391-401. ISBN 978-80-7435-673-5.

[22] ŠIMEK, Miloslav, Dana ELHOTTOVÁ a Václav PIŽL. *Živá půda* [online]. 1. Česká republika: Serifa, 2015 [cit. 2020-12-28]. ISBN 978-80-200-2567-8. Dostupné z: file:///C:/Users/Natalie/Downloads/5544_Strategie_Ziva_puda.pdf

[23] LEE, Changsu, Joon Yong KIM, Hye Seon SONG, Yeon Bee KIM, Yoon-E CHOI, Changmann YOON, Young-Do NAM a Seong Woon ROH. Genomic Analysis of Bacillus licheniformis CBA7126 Isolated from a Human Fecal Sample. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2017, 8(8) [cit. 2021-5-4]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2017.00724

[24] TAKAHASHI, Yōko a Takuji NAKASHIMA. Actinomycetes, an Inexhaustible Source of Naturally Occurring Antibiotics. *Antibiotics* [online]. 2018, 7(2) [cit. 2021-5-4]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics7020045

[25] KLABAN, Vladimír. *Obecná a environmentální mikrobiologie*. 1. Hradec Králové: Gaudeamus, 2018, s. 395. ISBN 978-80-7435-673-5.

[26] BROŽOVÁ, Martina, Petra KUBIZNIAKOVÁ a Dagmar MATOULKOVÁ. Brewing Microbiology - Bacteria of the Genera Bacillus, Brevibacillus and Paenibacillus and Cultivation Methods for their Detection - Part 1. *Kvasny Prumysl* [online]. 2018, 64(2), 50-57 [cit. 2021-5-4]. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp201813

[27] RUIU, Luca. Brevibacillus laterosporus, a Pathogen of Invertebrates and a Broad-Spectrum Antimicrobial Species. *Insects* [online]. 2013, 4(3), 476-492 [cit. 2021-5-4]. ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects4030476

[28] PARMAR, Parmvir, Milani SIVAPRAGASAM a Vicente CORRALES-MEDINA. A Case of Brevibacillus brevis Meningitis and Bacteremia. *Case Reports in Infectious Diseases* [online]. 2020, 2020(7), 1-2 [cit. 2021-5-4]. ISSN 2090-6625. Dostupné z: doi:10.1155/2020/5931235

[29] KONEČNÁ, Eva. *Výskyt mikroorganismů na prachových částicích a jejich vliv na mikrobiom dýchacích cest člověka*. Česká republika, 2019. Diplomová práce. Masarykova Univerzita. Vedoucí práce Mgr. Petra Vídeňská, Ph.D.

[30] SIEBIELEC, Sylwia, Małgorzata WOŹNIAK, Anna GAŁĄZKA a Grzegorz SIEBIELEC. MICROORGANISMS AS INDOOR AND OUTDOOR AIR BIOLOGICAL POLLUTION. *Postępy Mikrobiologii - Advancements of Microbiology* [online]. 2020, 59(2), 115-127 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0079-4252. Dostupné z: doi:10.21307/PM-2020.59.2.009

[31] LASKIN, Allen. *Advances in Applied Microbiology* [online]. 2012 [cit. 2021-1-20]. ISBN 9780123948052. ISSN 0065-2164. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012394805200004X?via=ihub

[32] HANSON, Blake, Yanjiao ZHOU, Eddy J. BAUTISTA, et al. Characterization of the bacterial and fungal microbiome in indoor dust and outdoor air samples: a pilot study. *Environmental Science: Processes &*

Impacts [online]. 2016, 18(6), 713-724 [cit. 2021-5-4]. ISSN 2050-7887. Dostupné z: doi:10.1039/C5EM00639B

[33] VÉDL, Lukáš. *Diagnostické metody určení závad u klimatizační jednotky*. Česká republika, 2015. Bakalářská práce. ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI. Vedoucí práce Doc. Ing. Josef Formánek, Ph.D.

[34] BEZDĚK, Matěj. *Automobilní klimatizace*. Česká republika, 2012. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Jiří Hejčík, Ph.D.

[35] Mezinárodní klasifikace vzduchových filtrů. *Filco.cz* [online]. Hradec Králové [cit. 2021-01-22]. Dostupné z: https://www.filco.cz/uvod/knihovna/mezinarodni-klasifikace-vzduchovych-filtru/

[36] OBITKOVÁ, Daniela a Emil PAVLÍK. Microbial contamination of HEPA filters of household vacuum cleaners. In: RALBOVSKÁ, D. a J. HALAŠKA. *Aspekty práce pomáhajících profesí*. Kladno: ČVUT, Fakulta biomedicínského inženýrství, 2020, s. 5-16. ISBN 978-80-01-06783-3. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.14311/BK.9788001067833

[37] FIRST, Melvin W. Hepa Filters. *Journal of the American Biological Safety Association* [online]. 1998, 3(1), 33-42 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1091-3505. Dostupné z: doi:10.1177/109135059800300111

[38] HEPA filtration facts. In: *Donaldson aerospace and defense* [online]. North America, 2020 [cit. 2021-02-01]. Dostupné z: https://www.donaldson.com/content/dam/donaldson/aerospace-

defense/literature/north-america/products/air/environmental-control-systems/particulate-antimicrobial-removal/hepa/f112206-eng/HEPA-Filtration-Facts.pdf

[39] KTE'PI, Bill. High-efficiency particulate air system. In: *Encyclopedia Britannica* [online]. 2015 [cit. 2021-02-04]. Dostupné z: https://www.britannica.com/technology/high-efficiency-particulate-air-system

[40] SANDLE, Tim. Cleanrooms, isolators and cleanroom technology. *Sterility, Sterilisation and Sterility Assurance for Pharmaceuticals: Technology, Validation and Current Regulations* [online]. Woodhead Publishing, 2013, s. 18 [cit. 2021-02-01]. ISBN 9781907568381. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/hepa-filter

[41] HEPA. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2021-02-04]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/HEPA

[42] STUART, David G. Primary Containment (Chapter 3). *Journal of the American Biological Safety Association* [online]. 2016, 4(1), 6-16 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1091-3505. Dostupné z: doi:10.1177/109135059900400105

[43] SANDERS, Erin R. Aseptic Laboratory Techniques: Volume Transfers with Serological Pipettes and Micropipettors. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, 2012(63) [cit. 2021-5-4]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/2754

[44] SANDERS, Erin R. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, 2012(63) [cit. 2021-5-4]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/3064

[45] GVOZDEVA, Viktoriya. *Mikrobiální kontaminace filtru kabinového vzduchu dopravního letadla Airbus A319 po vyjmutí v rámci pravidelné servisní výměny*. Česká republika, 2018. Bakalářská práce. ČVUT. Vedoucí práce MUDr. Emil Pavlík CSc.

[46] Laminar Flow Hood. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Czech Republic [cit. 2021-02-20]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-equipment/laminar-flow-hood.html?ef_id=CjwKCAiAg8OBBhA8EiwAlKw3ksihEd3g6sUMfnaIjLQABceuzE-fo5dwJorUWLQaQ3BcOhKxu9wtpBoC2ucQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!305473461783!b!!g!!&cid=bid_clb_cce_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con&s_kwcid=AL!3652!3!305473461783!b!!g!!&gclid=CjwKCAiAg8OBBhA8EiwAlKw3ksihEd3g6sUMfnaIjLQABceuzE-fo5dwJorUWLQaQ3BcOhKxu9wtpBoC2ucQAvD_BwE

[47] *ČSN ISO EN 18593: Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metody specifikující techniky vzorkování z povrchů*. Praha: Česká agentura pro standardizaci, 2019.

[48] VOTAVA, Miroslav. *LÉKAŘSKÁ MIKROBIOLOGIE VYŠETŘOVACÍ METODY*. 1. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.

[49] *Anaerocult® C*. Germany.

[50] KOPECKÁ, Jana a Gabriela ROTKOVÁ. *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2017 [cit. 2021-02-22]. ISBN 978-80-210-8787-3. ISSN 1802-128X. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/prace_mikroskop.html

[51] SENGUPTA, Pavel, Kalap KHANRA, Amit CHOWDHURY a Pallab DATTA. Lab-on-a-chip sensing devices for biomedical applications. *Bioelectronics and Medical Devices*. 1. Great Britain: Woodhead Publishing, 2019, s. 47-95. ISBN 9780081024201.

[52] DE CAROLIS, Elena, Antonietta VELLA, Luisa VACCARO, Riccardo TORELLI, Teresa SPANU, Barbara FIORI, Brunella POSTERARO a Maurizio SANGUINETTI. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *The Journal of Infection in Developing Countries* [online]. 2014, 8(09), 1081-1088 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1972-2680. Dostupné z: doi:10.3855/jidc.3623

[53] *MALDI Biotyper® Changing Microbiology*. Bremen, Germany, 2019.

[54] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2008. ISBN 978-80-210-3841-7.

[55] *Návod k použití respiračního panelu QIAstat-Dx® Respiratory SARS-CoV-2 Panel (příručka)*. 1. Německo, 2020.

[56] BARON, Samuel, ed. *Medical microbiology*. 4. Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. ISBN 0-9631172-1-1.

[57] STAROSTIL, K. V. et al. Identification of Bacillus strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Scientific Reports* [online]. 2015, **2015**(5), 9 [cit. 2021-04-20]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep16989

[58] PRINCESS, Isabella, T. NATARAJAN a Siddhartha GHOSH. When good bacteria behave badly: a case report of Bacillus clausii sepsis in an immunocompetant adult. *Access Microbiology* [online]. 2020, 2(4) [cit. 2021-5-4]. ISSN 2516-8290. Dostupné z: doi:10.1099/acmi.0.000097

[59] HELMBUCH, Brian K., Chang-Yu WU a Joseph WANDER. Viral Penetration of High Efficiency Particulate Air (HEPA) Filters. *Air Force Research Laboratory* [online]. 2009, 2009, 40 [cit. 2021-4-20]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/235048517_Viral_Penetration_of_High_Efficiency_Particulate_Air_HEPA_Filters_PREPRINT

[60] MITTAL, Himanshu, Simon R. PARKS, Thomas POTTAGE, James T. WALKER a Allan M. BENNETT. Survival of Microorganisms on HEPA Filters. *Applied Biosafety* [online]. 2011, 16(3), 163-166 [cit. 2021-5-4]. ISSN 1535-6760. Dostupné z: doi:10.1177/153567601101600305

[61] KAMAR, Rita, Michel GOHAR, Isabelle JÉHANNO, Agnès RÉJASSE, Mireille KALLASSY, Didier LERECLUS, Vincent SANCHIS a Nalini RAMARAO. Pathogenic Potential of Bacillus cereus Strains as Revealed

by Phenotypic Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2012, 51(1), 320-323 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.02848-12

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Jednotlivé mechanismy filtrace – filtrace setrvačností, difúzí, intercepcí a proséváním [38]. 28

Obrázek 2: Struktura HEPA filtru a ilustrace zachycení částic intercepcí, setrvačností a difúzí [41]. 30

Obrázek 3: Závislost účinnosti filtru na průměru částice a ilustrace konkrétních mechanismů filtrace [41]. 30

Obrázek 4: Originální balení a generátor plynů Anaerocult® C od firmy Merck (Natálie Klusová, 2021). 36

Obrázek 5: Uzavřený anaerostat s půdami a s vloženým generátorem plynů Anaerocult® C (Natálie Klusová 2021). 36

Obrázek 6: Ilustrativní fotografie postupu Gramova barvení (Natálie Klusová, 2021). 38

Obrázek 7: Ilustrace postupu při analýze MALDI Biotyper® system [53]. 41

Obrázek 8: Ilustrace přenosu tekutého alikvotu do kazety [55]. 43

Obrázek 9: Fotografie kazety QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel Cartridge (Natálie Klusová, 2021). 44

Obrázek 10: Bacillus cereus (vlevo), Bacillus subtilis (uprostřed), Bacillus licheniformis (vpravo) (Natálie Klusová, 2021). 47

Obrázek 11: Gramovo barvení – Bacillus cereus (vlevo nahoře), Bacillus subtilis (vpravo nahoře), Bacillus licheniformis (dole) (Daniela Obitková, Natálie Klusová, 2021). 48

Obrázek 12: Výsledek testování vzorku z výstupní strany filtru číslo 22 provedeného multiplex PCR – totožný s výsledkem vstupní strany. 54

Obrázek 13: Validní kontrola zobrazená ve formě amplifikační křivky – závislost intenzity fluorescence na počtu cyklů (Natálie Klusová, 2021). 55

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Postup Gramova barvení (Natálie Klusová, 2021). 37

Tabulka 2: Detekované patogeny respiračním panelem QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 (dle [55]). 45

Tabulka 3: Plochy vybraných filtrů..... 46

Tabulka 4: Počty konkrétních bakteriálních kolonií kultivovaných ze stěrů vstupní a výstupní plochy filtru 11 a dopočítané kvantifikace na plochu filtru.. 49

Tabulka 5: Počty konkrétních bakteriálních kolonií kultivovaných ze stěrů vstupní a výstupní plochy filtru 16 a dopočítané kvantifikace na plochu filtru. 49

Tabulka 6: Počty konkrétních bakteriálních kolonií kultivovaných ze stěrů vstupní a výstupní plochy filtru 17 a dopočítané kvantifikace na plochu filtru. 50

Tabulka 7: Počty konkrétních bakteriálních kolonií kultivovaných ze stěrů vstupní a výstupní plochy filtru 19 a dopočítané kvantifikace na plochu filtru. 50

Tabulka 8: Počty konkrétních bakteriálních kolonií kultivovaných ze stěrů vstupní a výstupní plochy filtru 20 a dopočítané kvantifikace na plochu filtru. 50

Tabulka 9: Počty konkrétních bakteriálních kolonií kultivovaných ze stěrů vstupní a výstupní plochy filtru 21 a dopočítané kvantifikace na plochu filtru. .51

Tabulka 10: Dílčí a celkový záchyt kultivovaných bakterií na filtru 11. 51

Tabulka 11: Dílčí a celkový záchyt kultivovaných bakterií na filtru 16. 51

Tabulka 12: Dílčí a celkový záchyt kultivovaných bakterií na filtru 17..... 52

Tabulka 13: Dílčí a celkový záchyt kultivovaných bakterií na filtru 19. ... 52

Tabulka 14: Dílčí a celkový záchyt kultivovaných bakterií na filtru 20. ... 52

Tabulka 15: Dílčí a celkový záchyt kultivovaných bakterií na filtru 21. ... 52

Tabulka 16: Výsledky z přístroje MALDI Biotyper® System a příslušné hodnoty Score value. 53