



ČESKÝ METROLOGICKÝ INSTITUT

OBLASTNÍ INSPEKTORÁT BRNO

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA Č. 6014-TR-Z0002-22

o plnění úkolu TR

Rozvoj metrologie bioaerosolů


Odpovědný řešitel: Mgr. Petr Klapetek, Ph.D.

Vypracovali: Ing. Petr Grolich
Bc. Václav Hortvík
Mgr. Petr Klapetek, Ph.D.
Mgr. Radek Šlesinger, Ph.D.
Mgr. Jiří Šperka, Ph.D.
Mgr. Miroslav Valtr, Ph.D.

Ředitel VOJ: Ing. Radovan Wiecek
ředitel OI Brno

Datum: 30. listopadu 2022

Schválil: RNDr. Pavel Klenovský
odborný ředitel pro FM

	Český metrologický institut Oblastní inspektorát Brno	Zpráva úkolu TR č. 6014-TR-Z0002-22	Počet příloh: 1 Počet listů: 2/24
---	---	---	--------------------------------------

Resumé

Hlavním cílem tohoto úkolu je rozvoj v oblasti metrologie bioaerosolů. Cílem úkolu je tedy přispět k rozvoji fundamentální metrologie bioaerosolových částic (jako jsou viry, spory, pyly). Základní výzkum v oblasti bioaerosolů je důležitý např. v oblasti lidského zdraví (patogenní jsou některé virové částice nebo bakterie, pylové částice vyvolávají alergie). Tyto částice se svými rozměry i tvary výrazně odlišují od referenčních částic používaných pro průmyslové kalibrace a naší snahou bylo rozšířit měřicí schopnosti směrem k takovým typům částic. To zahrnovalo především experimenty za hranicemi stávajících limitů velikostí částic, které jsme schopni generovat a detekovat, a experimenty s nepravidelnými částicemi, které by mohly sloužit jako model pro odhad nejistot při měření reálných (také nepravidelných) biologických objektů.



Obsah

Resumé	2
Obsah	3
1 ÚVOD	4
1.1 Bioaerosol	4
1.2 Metrologie bioaerosolů	4
2 POPIS ŘEŠENÍ ÚKOLU	8
2.1 Výzkum	8
2.2 Generátor bioaerosolu	9
2.3 DMA a SMPS	9
2.3.1 Srovnání DMA ÚChP AVČR a Grimm	10
2.4 Měření na realistických vzorcích	11
2.4.1 100nm PSL částice	11
2.4.2 PSL částice nepravidelného tvaru	12
2.4.3 Pylové částice	13
2.4.4 Arizona dust	14
3 DOSAŽENÉ VÝSLEDKY	19
4 ČERPANÉ NÁKLADY NA ÚKOL	20
5 ZÁVĚRY	21
Seznam bibliografických citací	23
PŘÍLOHY	24



1. ÚVOD

1.1. Bioaerosol

Knihou *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles* [1] v kapitole věnující se bioaerosolům tyto definuje jako aerosoly biologického původu. To znamená, že zahrnují viry, živé organismy (bakterie nebo houby) a části či produkty organismů jako spory hub, pyly a alergeny zvířat. Podobnou definici najdeme např. v knize *Aerosol measurement: principles, techniques, and applications* [2]. V anglické literatuře se pro označení bioaerosolů můžeme setkat i s pojmem *viable aerosols* [3]. Je potřeba zdůraznit, že v případě bioaerosolů suspendované částice ve vzduchu nemusí být vždy tvořené živými organismy, jak je tomu např. v případě bakterií, tvoří je i neživé částice, mezi které patří např. dříve zmíněné produkty některých organismů. Bioaerosoly mají často vliv na živé organismy a jsou nezdědka součástí složitých přírodních ekosystémů. Některé druhy aerosolových částic biologického původu, např. viry, mohou být pro člověka patogenní.

Širší definici bioaerosolu uvádí kniha *Bioaerosols handbook* [4], ve které prof. Hirst hovoří o bioaerosolu jako o aerosolu skládajícím se z částic biologického původu či biologické aktivity. Aerobiologie jako pojem označuje, jednoduše řečeno, obor studující transport bioaerosolových částic [5,6]. Další pojem, se kterým se můžeme setkat, je pak mikrobiologie vzduchu, tento obor se zabývá aerosolovými částicemi mikrobiologického původu [7], bližší detaily o této oblasti mikrobiologie jsou uvedeny v open access článku *Microbial aerosols: sources, properties, health effects, exposure assessment – a review* [7] či v knize *Microbiology of aerosols* [8].

S některými vlastnostmi aerosolových částic biologického původu se blíže seznámíme v dalším textu, ovšem zabýváme se jen vybranými druhy bioaerosolů v kontextu našeho výzkumu v oblasti metrologie. Pro obecné informace o různých druzích bioaerosolů odkazujeme čtenáře na další literaturu, např. na podkapitulu *Bioaerosol types* v knize [2] či první kapitulu v knize [8].

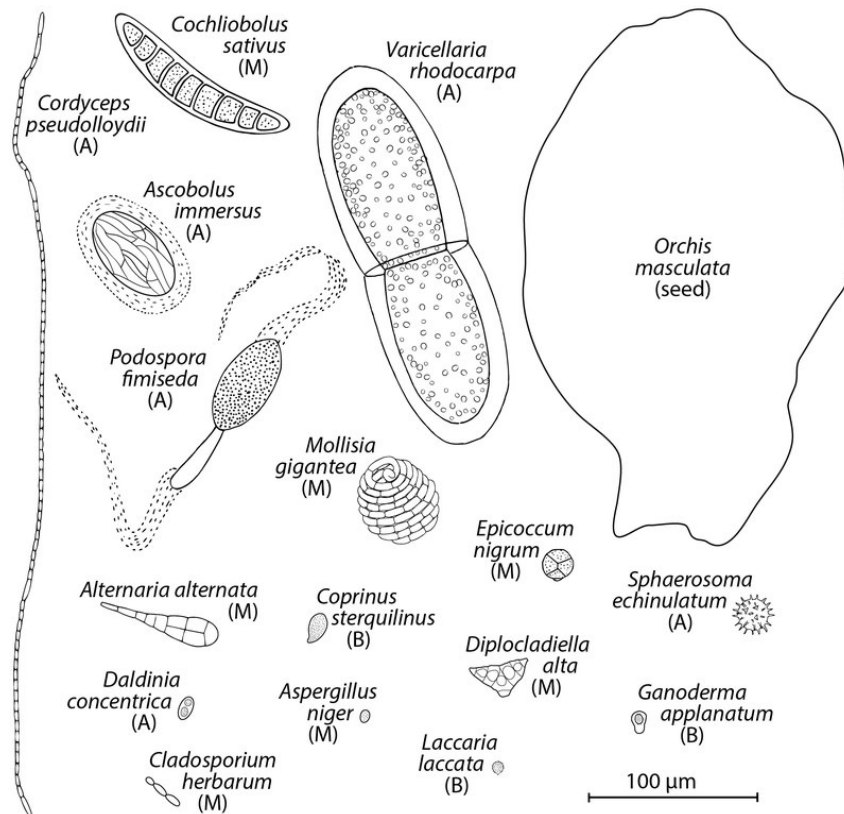
1.2. Metrologie bioaerosolů

Částice biologického původu, stejně jako mnohé další částice přírodního původu, jsou často nepravidelného tvaru a rozličných velikostí. Mezi bioaerosolovými částicemi sice najdeme i takové, které se mohou blížit tvarem kouli, např. některé pylové částice, ovšem v jiných případech může být situace daleko složitější, např. v případě spor hub, jak to znázorňuje obrázek č. 1.

Komplexní situaci dobře ilustruje kapitola *Biological particle sampling* v knize [2], tedy že bioaerosoly se mohou vyskytovat:

- ve formě jednotlivých spor, zrněk pylu, bakteriálních buněk, virů,
- v podobě agregátů několika spor/buněk či jiného biologického materiálu,
- jako produkty nebo fragmenty např. spor a buněk,
- jako biologický materiál, který je nesen částicemi nebiologického původu.

Přirozeně se může jednat i o kombinaci zmíněných forem bioaerosolu, navíc většinou ve směsi s částicemi nebiologického původu. Složení bioaerosolových částic se různí také např. v závislosti na tom, zda se jedná o vnitřní, či vnější prostředí. Konkrétní naměřená velikost bioaerosolových částic závisí, stejně jako u jiných druhů aerosolových částic, na fyzikálním principu měření a s ním souvisejícím ekvivalentním průměru částice, který je možné dané nepravidelné částici přiřadit a s kterým se běžně v aerosolové vědě pracuje (v krátkosti jsme ekvivalentní průměr popisovali v loňském úkolu technického rozvoje, který

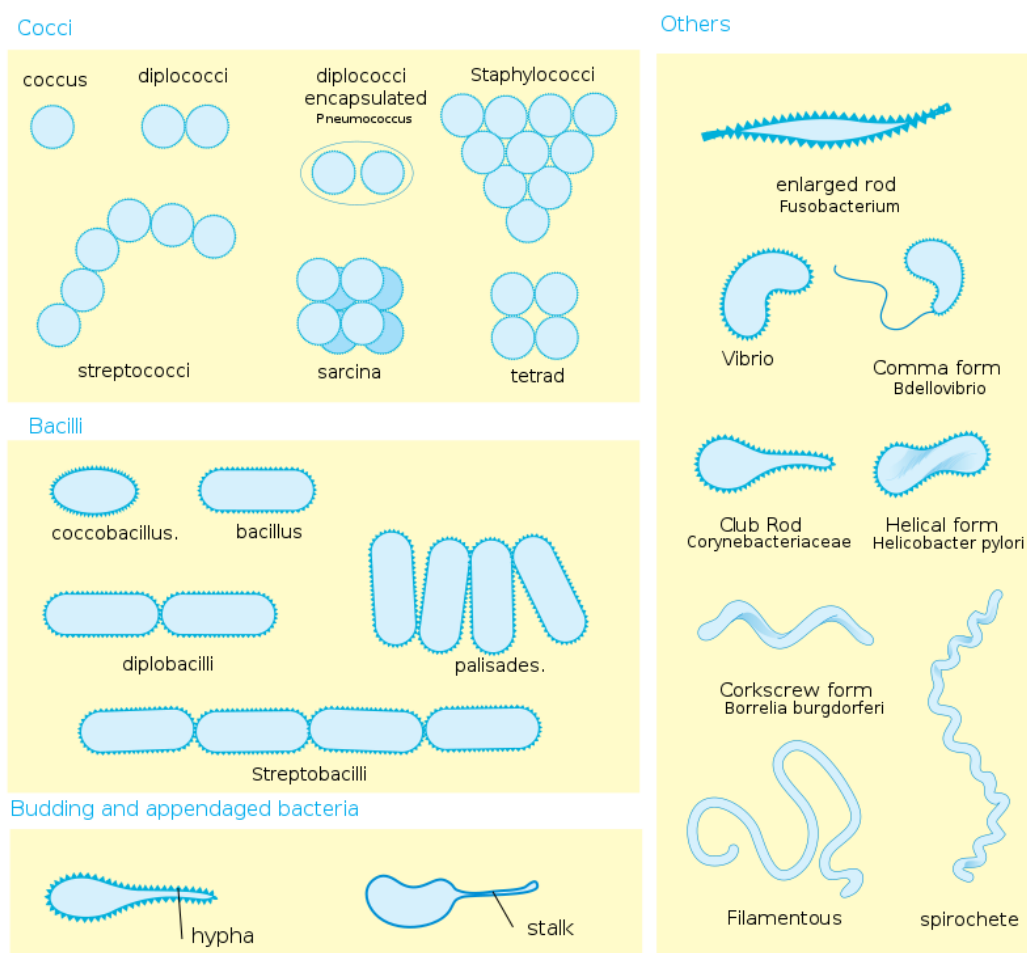


Obrázek 1: Ilustrativní obrázek znázorňující spory hub spolu s *prachovým* semínkem *orchis masculata* pro porovnání. Autor Anne Pringle, licence obrázku *Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International*. Obrázek převzat z Open Access článku [9], kde je adaptován z článku [10].

se věnoval ultrajemným částicím). Škála velikostí bioaerosolových částic je široká (nezávisle na zvoleném ekvivalentním průměru), některé spadají od oblasti utrajemných částic (velikost utrajemných částic je většinou definovaná mezi 1 nm až 100 nm, viz loňský úkol UTR zabývající se ultrajemnými částicemi), přes oblast prachových částic frakce $PM_{2,5}$ (částice o průměru menším než 2,5 μm) a PM_{10} (částice o průměru menším než 10 μm), po největší částice, které ještě mohou být suspendované ve vzduchu. Pro bližší představu dále uvádíme přibližné velikosti některých typů částic biologického původu:

- Viry – velikost samotných obnažených virových částic, obsahujících DNA či RNA, se pohybuje přibližně od 20 nm po 300 nm [1]. Viry způsobují u lidí infekční onemocnění, jako je chřipka, plané neštovice, spalničky, či Covid-19. Víme, že některá virová onemocnění se přenášejí z člověka na člověka kapénkami, např. při kýchní, kdy jsou na počátku virové částice obsažené v kapénkách. Hledají se ale i aplikace, ve kterých mohou být aerosolizované viry užitečné, např. v podobě fagoterapie [11]. V běžné laboratoři není možné bezpečně pracovat s nebezpečnými patogeny v podobě některých virů, proto se hledají alternativy, jako např. částice podobné virům, které jsou neinfekční [12].
- Spory hub – jejich velikost je v rozmezí 0,5 μm až 30 μm [1], rozličné spory hub znázorňuje ilustrativní obrázek č. 1. Vědní obor věnující se sporám hub ve formě bioaerosolu se nazývá aeromykologie a je důležitý např. kvůli dopadům spor hub na lidské zdraví nebo také na zemědělství [13].

- Bakterie – mají rozličný tvar, viz obrázek č. 2 typicky mívají velikost v rozmezí 0,5 μm až 5 μm [14], ovšem setkáme se i s menšími [15], či výrazně většími [16] bakteriemi. Také bakterie mohou být pro zdraví člověka nebezpečné a některé se mohou šířit přenosem kapénkami.



Obrázek 2: Ilustrativní obrázek znázorňující morfologie bakterií a jejich možné uspořádání. Autor Mariana Ruiz, obrázek volně uvolněn jako *public domain* dílo [14].

- Pyly – pylové částice mají často přibližně kulovitý tvar a jsou relativně velké s velikostmi v rozmezí 10 μm až 100 μm [1]. Pylové částice mohou také vyvolávat alergii, a ovlivňovat tak lidské zdraví.

Jak je patrné z předchozího krátkého přehledu, bioaerosolové částice se liší nejen ve velikosti, ale také v morfologii. Některé druhy částic biologického původu se mohou z hlediska tvaru velmi blížit monodisperzním částicím, zatímco jiné druhy bioaerosolových částic jsou polydisperzní. Navíc se některé částice biologického původu, např. určité viry, šíří v podobě kapének, ve kterých se může vyskytovat různý počet virových částic a s časem se obvykle kapénky vlivem odpařování mění, což činí popis ještě složitějším. Jak bylo zmíněno již dříve, bioaerosolové částice se také mohou shlukovat, či mohou ulpívat na částicích nebiologického původu.

Z hlediska kvantitativního měření bioaerosolů se velmi často využívají vzorkovací metody, často stejné či podobné metodám pro běžné aerosoly, a post situ analýzy samotných navzorkovaných částic biologického



původu, např. pomocí optické či elektronové mikroskopie s možným využitím environmentálního módu. Samotné vzorkování probíhá často tak, že se částice zachycují buď dopadem (impaktem) na daný substrát, nebo se, pro pozdější analýzy, využívá vzorkování na filtr. Tento přístup, nejprve vzorkovat a analyzovat až po určité době, má samozřejmě jisté nevýhody, mimo jiné možné změny částic při vzorkování, během skladování či při samotné analýze, např. ve vakuu rastrovacího elektronového mikroskopu.

Bioaerosolové částice je ale možné měřit i přímo, tedy bez předchozího vzorkování a případného skladování, např. pomocí optických metod využívajících rozptylu světla na částicích, fluorescence částic či Ramanovy spektroskopie. Bližší přehled různých měřicích metod je možný nalézt např. v knize *Bioaerosol detection technologies* [17] či v knize *Aerosol Science* [18]. Porovnání výhod a nevýhod jednotlivých měřicích metod týkajících se částic biologického původu je uvedeno v publikaci [19]. U některých metod, např. při měření klasickým optickým čítačem částic, není možné při měření rozlišit částice biologického původu od těch, které biologického původu nejsou, výsledkem měření je tedy pouze informace o všech částicích společně.

Tato práce se zaměřuje zejména na možnosti měření bioaerosolových částic za pomoci stávajícího přístrojového vybavení, které máme v naší laboratoři na Českém metrologickém institutu k dispozici. Toto zařízení je primárně určeno pro kalibrace čítačů částic, které se dle normativních předpisů provádí na kulových částicích o známých rozměrech (v řádu stovek nm až jednotek μm). Takové velikosti a tvary jsou velmi vzdálené reálné situaci (i v případě skutečných prachových částic) – byť je tedy možné čítače částic podle normy opakovaně kalibrovat, či mezi sebou porovnávat, o skutečných parametrech částic, které měřicí přístroje nasávají se mnoho nedozvíme. V rámci řešení úkolu jsme se zaměřili na některé dílčí aspekty zacházení s nepravidelnými částicemi, které se vyskytují v bioaerosolech, ve snaze odhadnout a také pokud možno posunout limity stávajícího zařízení, a to konkrétně těmito aktivitami:

- porovnáním přístrojů, které můžeme použít pro detekci velikosti částic a jejího rozdělení,
- testováním dolního limitu detekce na velmi malých částicích,
- testováním horního limitu detekce a schopnosti generovat a měřit nepravidelné částice na uměle vytvořených nepravidelných latexových částicích,
- vývojem metod generování aerosolů velkých nepravidelných částic, jako jsou pyl a reálný prach.

V úkolu menšího rozsahu, jakým byl tento úkol technického rozvoje, nebylo možné vytvořit ucelené řešení pro generování a detekci částic s přesahem do vědecké či průmyslové oblasti (kalibrací) a ani to nebylo cílem. Naším cílem bylo prozkoumat oblasti do kterých by bylo možné dále expandovat. Takových je řada, například automatické analyzátory pylů využívající hybridního měření optických a fluorescenčních charakteristik a umělé inteligence pro klasifikaci pylů. Bez jednoduchých kroků a technických základů řešených v tomto úkolu technického rozvoje, jako je generování aerosolů pylů, bychom nicméně nemohli v budoucnu k takové problematice směřovat.



2. POPIS ŘEŠENÍ ÚKOLU

2.1. Výzkum

V našem výzkumu se zaměřujeme zejména na tyto hlavní oblasti:

- Výzkum mířící na studium chování virových částic, který provádíme pomocí měření s velmi malými etalonovými částicemi nebiologického původu o podobných vlastnostech (velikost, tvar, atd.), jaké mají diskutované virové částice (např. viriony SARS-CoV-2). Měření s takto zvolenými částicemi nebiologického původu může totiž hodně napovědět o chování podobných částic biologického původu, v tomto případě o chování virových částic.
- Výzkum mířící na studium chování pylových částic a spor hub. Tento výzkum provádíme, analogicky k předchozímu případu, pomocí měření s většími etalonovými částicemi nebiologického původu o podobných vlastnostech (velikost, tvar, atd.), jaké mají některé pylové částice a spory hub.
- Výzkum spojený s vhodným způsobem generování vybraných částic pro experimenty a s možnostmi využití stávajícího přístrojového vybavení pro měření v oblasti částic biologického původu.

Použití přímo samotných částic biologického původu pro experimentování není v mnoha případech v běžných laboratorních podmínkách možné. Některé bioaerosolové částice jsou totiž patogenní a mohou u člověka způsobovat závažná onemocnění. V tom případě je třeba s nimi pracovat ve speciálních laboratořích dané biologické ochrany určených pro nakládání s takovým materiálem, tj. v tzv. *Biosafety Level* laboratoři daného stupně [20]. Laboratoř pro práci s nebezpečným biologickým materiálem nemáme k dispozici, pro experimenty tedy můžeme použít pouze zdraví neškodné částice, se kterými je možné pracovat v běžné laboratoři. Nemožnost pracovat s některými částicemi biologického původu nemá pouze nevýhody, protože reálné aerosoly biologického původu mají tu vlastnost, že se většinou nejedná o monodisperzní aerosol (tj. aerosol tvořený částicemi různých velikostí). Z hlediska metrologie je samozřejmě výhodnější pracovat s aerosolem monodisperzním, který má jasně definované vlastnosti. K některým patogením částicím existují komerčně dostupné, zdraví neohrožující a původním částicím podobné náhrady, jak je tomu v případě virům podobných částic (VLP – Virus Like Particle), které jsme našli dostupné u americké firmy *Gen-Target Inc.* či firmy *Leadgene* z Taiwanu. Tito prodejci nabízejí mimo jiné i částice podobné koronaviru SARS-CoV-2. Takové částice kopírují vnější strukturu skutečného viru a je s nimi možné pracovat za nižších bezpečnostních požadavků [21]. Cestou nákupu těchto částic jsme se v tomto projektu nevydali, neboť skladování a práce s VLP částicemi je obvykle složitější než s polystyrenovými částicemi, které jsme pro jednoduchost zvolili.

Při výběru vhodných částic pro experimenty je třeba zvážit několik faktorů, jako je podobnost vůči daným biologickým částicím, dostupnost částic, způsob skladování, způsob generování daných částic a vhodnost vzhledem k dostupnému měřicímu přístrojovému vybavení. Pro naše experimenty jsme zvolili tyto částice:

- Pro výzkum mířící na studium chování virových částic jsme zvolili polystyrenové částice o velikosti 100 nm, které máme dostupné v podobě částic suspendovaných ve vodě, tak jak je dodává výrobce. Polystyren má hustotu přibližně 1,055 g/cm³. Např. virus SARS-CoV-2 má přibližnou velikost kolem 80 nm, přibližně kulovitý tvar a vyskytuje se v kapénkách, které mají hustotu blízkou vodě. Takže naše volba je poměrně vhodná. Používáme částice *Nanosphere Size Standards* suspendované ve vodě, protože tyto malé částice jsme schopni aerosolizovat jednoduše pomocí atomizéru TSI podobně, jako jsme zvyklí při kalibracích optických čítačů částic.

	Český metrologický institut Oblastní inspektorát Brno	Zpráva úkolu TR č. 6014-TR-Z0002-22	Počet příloh: 1 Počet listů: 9/24
--	---	---	--------------------------------------

- Výzkum mřící na studium chování pylových částic a spor hub provádíme podobně s pylovými částicemi chmele. Jako alternativu (byť nebiologického původu), poskytující polydisperzní aerosol s jiným rozdělením velikostí částic, lze využít také standardní vzorek prachových částic.

V této práci se věnujeme měřením fyzikálních parametrů částic aerosolu, zejména měření jejich velikosti. K dispozici máme následující dostupné měřicí metody a vybavení:

- Mikroskopie: V našich laboratořích máme možnost provádět měření navzorkovaných individuálních částic pomocí optické mikroskopie a mikroskopie atomárních sil. Výhodou je, že jsme schopni rozlišit tvar částic, což umožňuje identifikovat částice biologického původu. Nevýhodou těchto metod je, že nejsme schopni naměřit velký počet částic, ale pouze malý vzorek individuálních částic.
- Optické čítání částic: Pro měření celkového počtu částic můžeme využít klasický optický čítač částic, či kondenzační čítač částic. Výhodou je, že jsme schopni měřit většinu částic zastoupených v daném aerosolu, jedinou limitací je spodní hranice velikostní detekce jednotlivých přístrojů. Nevýhodou je, že takto čítáme všechny částice a nejsme schopni, kromě hrubého rozdělení částic do velikostních kanálů, rozlišit další charakteristiky částic, a nedokážeme tak rozlišit částice biologického původu od jiných částic.
- Zařízení SMPS (Scanning Mobility Particle Sizer): Principem měření je získávání ekvivalentních velikostí částic z elektrické pohyblivosti nabitých částic. Aerosolové částice měříme in-situ v reálném čase. Nevýhodou je, že měříme pouze nabitě částice a nejsme schopni rozlišit částice biologického původu od ostatních. Popisu zařízení SMPS jsme se více věnovali v loňském úkolu technického rozvoje. Možnosti využití měření virových částic a VLP pomocí elektrické mobility v aerosolovém výzkumu pěkně popisuje review článek *Physical analysis of virus particles using electrospray differential mobility analysis* [22]. SMPS je také možné propojit s dalšími zařízeními pro komplexnější studia viz článek [23].
- K dispozici máme jednoduchý vzorkovač aerosolu s držákem filtru, který je vyrobený na 3D tiskárně. Pomocí něj (a vakuové vývěvy) jsme schopni vzorkovat částice na filtr pro pozdější analýzy, např. pomocí mikroskopie.

2.2. Generátor bioaerosolu

Pěkný přehled experimentálního generování zkušebních bioaerosolů nalezneme v článku *Natural sources and experimental generation of bioaerosols: challenges and perspectives* [24]. V naší laboratoři máme možnost generovat aerosol z kapaliny pomocí atomizéru od firmy TSI či s využitím prachových částic pomocí zařízení Small-Scale Powder Disperser 3433.

2.3. DMA a SMPS

Součástí laboratorní aparatury používané na OI Brno pro kalibraci optických čítačů částic je zařízení DMA (differential mobility analyzer), které zajišťuje, že ze vstupujícího aerosolu jsou dále propuštěny pouze částice odpovídající či blízké nastavené velikosti. To je při kalibracích nezbytné, neboť všechny kalibrační procedury se opírají o předpoklad, že pracujeme s monodisperzním aerosolem. DMA pracuje na principu různé mobility částic různých velikostí v elektrickém poli. V závislosti na napětí mezi elektrodami (nastavitelném v rozsahu cca do 10 000 V) procházejí přes výstupní šterbinu vždy jen částice vhodné velikosti. Náš přístroj DMA byl zkonstruován a dodán Ústavem chemických procesů AVČR. Napětí mezi

	Český metrologický institut Oblastní inspektorát Brno	Zpráva úkolu TR č. 6014-TR-Z0002-22	Počet příloh: 1 Počet listů: 10/24

elektrodami lze nastavit externě pomocí řídicího napětí v rozsahu (0–10 V), a to buď manuálně integrovaným potenciometrem, nebo z počítače prostřednictvím analogového výstupu měřicí karty (DAQ) National Instruments.

K přepočtu mezi řídicím napětím a požadovanou propouštěnou velikostí částic slouží výpočetní vztah, implementovaný ÚChP AVČR v podobě jednoduchého spustitelného souboru nebo tabulky pro Microsoft Excel (viz Obrázek 3). Kromě sady konstantních parametrů závisí přepočet také na aktuálním stavu aerosolu v aparatuře (teplota, tlak, průtok), který poskytuje vestavěný hmotnostní průtokoměr.

Desired particle size	
d_p [nm]	100.00

Constants	
R_1 [cm]	2.5285
R_2 [cm]	3.3600
L [cm]	22.0730
λ_0 [nm]	67.3
T_0 [K]	293.15
p_0 [mbar]	1013.25
e [C]	1.60E-19
μ_0 [Pa.s]	1.83E-05
S	110.4
n	1

Calculated values	
λ [nm]	70.70729
μ [Pa.s]	1.85E-05
Cc [-]	2.984965
Z_p [m ² /V.s]	2.75E-08

Resulting DMA voltage	
U_{DMA} [V]	373.026

Potentiometer set-up	
U_{pot} [V]	0.298

Values from mass flowmeter	
T [K]	296.15
p [mbar]	977.00
Q_c [l/min]	3.00

Obrázek 3: Výpočetní tabulka pro MS Excel poskytnutá k DMA od ÚChP AVČR.

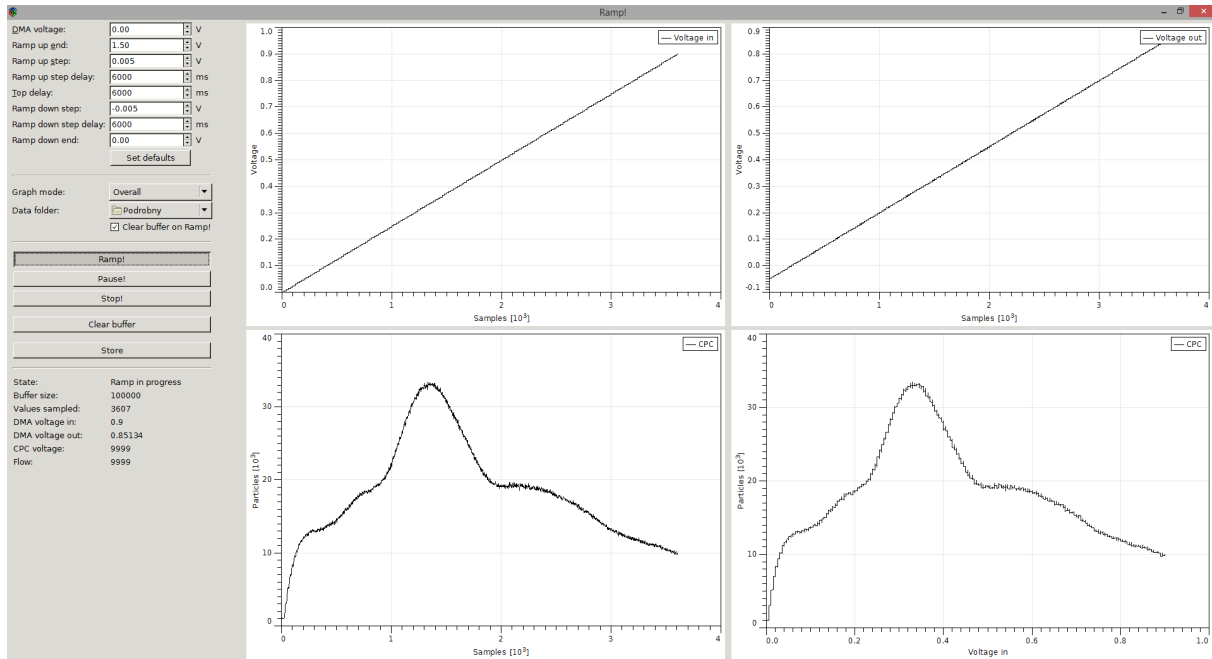
Postupnými malými změnami řídicího napětí tak lze plynule měnit velikost propouštěných částic, a ve spojení s kondenzačním čítačem částic (CPC, condensation particle counter), který zjišťuje koncentraci všech částic ve svém měřicím rozsahu bez rozlišení velikosti je tak možné vytvořit zařízení SMPS (scanning mobility particle sizer). To je pak schopné zjistit rozdělení velikostí částic v aerosolu pro daný rozsah velikostí (tj. řídicího napětí).

Kondenzační čítač TSI 3772 v naší laboratoři dokáže aktuální koncentraci částic indikovat kromě displeje také pomocí analogového výstupu, kde je zvolený rozsah koncentrací přepočten do rozsahu 0–10 V. S využitím tohoto analogového signálu byl na našem oddělení již dříve vyvinut vlastní software pro PC (viz Obrázek 4, který realizuje funkci SMPS. Hodnoty z analogového výstupu však byly při použití velkého rozsahu koncentrací velmi nepřesné a naopak při opuštění malého rozsahu oříznuté na 10 V. V rámci tohoto úkolu byl náš software pro SMPS přepracován pro komunikaci s CPC pomocí sériového rozhraní, které umožňuje vyčítat přesný údaj o počtu částic za poslední sekundu v celočíselné podobě. (Při ovládání pomocí sériového rozhraní je sice možné CPC TSI 3772 použít i jako SMPS, avšak jen s velmi omezenými možnostmi řízení na rozdíl od našeho vlastního řešení.)

V roce 2021 byl na ČMI zakoupen samostatný systém Grimm SMPS+C 5416, jehož součástí jsou vlastní DMA a kondenzační čítač. K řízení SMPS pak slouží dodaný ovládací software. Díky možnosti provozovat DMA a kondenzační čítač odděleně se tak nabídlo zkombinovat tyto komponenty se stávajícím DMA resp. CPC, a provést tak křížové ověření funkčnosti jednotlivých přístrojů.

2.3.1. Srovnání DMA ÚChP AVČR a Grimm

Bylo provedeno ověření stávajícího zařízení DMA od ÚChP AVČR s napětím nastaveným, aby odpovídalo zvolené velikosti částic 300, 500, resp. 1000 nm podle dodané výpočtové tabulky, pomocí SMPS Grimm.



Obrázek 4: Vlastní softwarový nástroj pro realizaci SMPS s využitím DMA od ÚChP AVČR a CPC TSI 3772.

(Právě částice o uvedených velikostech se na ČMI používají při kalibracích optických čítačů.) Při tom bylo měřeno rozdělení koncentrací jednotlivých velikostí částic ve výsledném aerosolu.

V rámci těchto experimentů byly kvůli ověření nepřítomnosti nežádoucích složek aerosolu prováděny hrubé scany přes celý rozsah zařízení (10–1357 nm). Pro bližší studium rozdělení velikosti částic v dané velikostní oblasti se lze zaměřit na vybraný rozsah, a rozlišení tak zlepšit.

Výsledky jednotlivých měření jsou znázorněny na Obrázcích 6 (300 nm), 7 (500 nm) a 8 (1000 nm). Červené sloupce znázorňují data z aktuálního průběhu měření, proložené čárové grafy představují data z předchozích běhů. Nižší peaky na menších velikostech než nominální jsou projevem špatně nabitých částic na výstupu z DMA. SMPS systémy pak obvykle disponují funkcí pro korekci počtů těchto nesprávně klasifikovaných částic. Horizontálně posunuté peaky vznikají vlivem rychlosti měření a setrvačnosti nastavení aparatury (ustálení trvá déle, než je nastavená doba vzorkování na daném napětí). Celkové prodloužení skenování kvůli delšímu setrvání na jednotlivých hodnotách napětí však také není žádoucí, neboť pak se více projevuje časová nestálost koncentrace částic v roztoku (zejména u větších částic).

2.4. Měření na realistických vzorcích

2.4.1. 100nm PSL částice

Jak již bylo uvedeno dříve, realizovat měření na tzv. virům podobných částicích je obtížné. Pro simulaci takových měření proto byly použity standardní 100nm PSL částice, které má ČMI k dispozici. Kvůli jejich malé velikosti není možné jejich měření na optickém čítači a je třeba použít kondenzační čítač.

Nejprve byla provedena měření pomocí SMPS Grimm. Měření SMPS ukazuje přítomnost reziduí vody, která se projevují jako částice o velikosti vyšší než 100 nm, v nižší koncentraci než referenční částice. (Takto se mj. projevuje také měřicí aparatura se špatně fungujícím vysoušením aerosolu.) K eliminaci těchto reziduí je třeba využít DMA s nastaveným pevným napětím odpovídající velikosti částic. Výsledky ukazuje Obrázek 9.



Obrázek 5: Aerosolová aparatura ČMI Brno na stole uprostřed snímku. Zleva: DMA od ÚChP AVČR, kondenzační čítač TSI 3772, optický čítač TSI AeroTrak 9310, SMPS systém Grimm.

Následně, pro ověření funkčnosti jednotlivých komponent, bylo totéž měření provedeno v obměně, kde byla jako DMA použita komponenta z přístroje Grimm (napětí stanovené pomocí výpočetní tabulky poskytnuté k našemu DMA nastaveno pomocí dodaného ovládacího softwaru Grimm) a na něj byl napojen náš SMPS využívající kondenzační čítač TSI. Provedené scany vykazovaly peaky právě na hodnotách napětí odpovídajících nominální velikosti částic, jak ukazuje Obrázek 10.

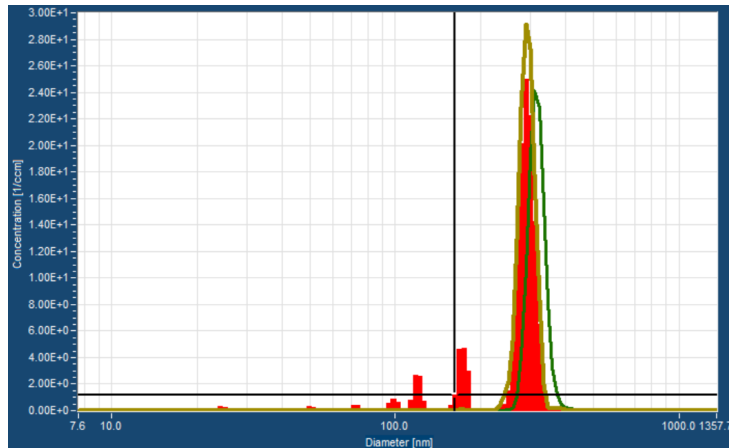
Navazujícím úkolem tak může být další rozšíření vlastního SMPS softwaru ČMI o funkce přepočtu mezi požadovanou propouštěnou velikostí částic a řídicím napětím na DMA.

2.4.2. PSL částice nepravidelného tvaru

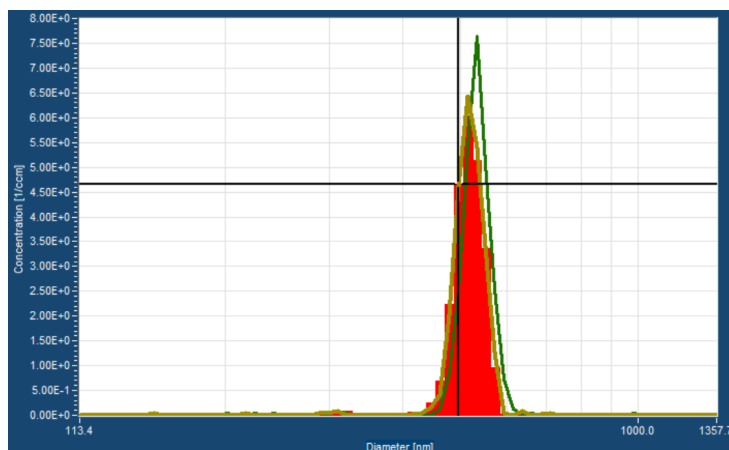
Mezi referenčními částicemi, které máme na ČMI k dispozici, jsou také PSL částice tvaru „peanut“ (snímek z AFM měření na ČMI a pořizovaný snímek částic ukazuje Obrázek 11) o nominální velikosti 1,8–2,7 μm . Ty jsme využili k simulaci měření bioaerosolů s částicemi neideálního tvaru a velikosti v menších jednotkách μm .

Náš kondenzační čítač TSI se svou integrovanou tryskou garantuje měření částic do velikosti 1 μm . Horní hranice velikosti měřených částic není přesně stanovena. Pro větší částice je třeba použít jinou trysku, navíc se již projevuje velký vliv dalších faktorů (průtok obalového vzduchu, délka vedení aerosolu atd.) Kondenzační čítač z principu zaznamenává veškeré částice bez rozlišení velikosti. Kvůli otestování jeho schopnosti měření větších částic bylo třeba zprovoznit jejich průchod přes DMA a provést měření v režimu SMPS. Ukázalo se však, že částice o velikostech nad 1,5 μm jsou již příliš těžké a ani po různých úpravách (průtok obalového vzduchu, proud částic) není možné je pomocí našeho DMA oddělit.

Další experiment – generování aerosolu pomocí atomizéru a jeho měření pomocí optického čítače TSI AeroTrak – přinesl výsledky dle očekávání: přístroj registroval částice v kanálu 1,0–3,0 μm , tj. částice větší než 1 a menší než 3 μm . Měření byla provedena s různými řídicími napětími na DMA (V_{min} – pro částice velikosti 1,8 μm , V_{mean} – pro částice velikosti cca 2,3 μm) a také s přímým zapojením čítače za atomizér – zde se ukázalo, jak velkým ztrátám u takto velkých částic dochází v DMA. Výsledky shrnuje



Obrázek 6: 300nm částice z DMA, měření SMPS přístrojem Grimm



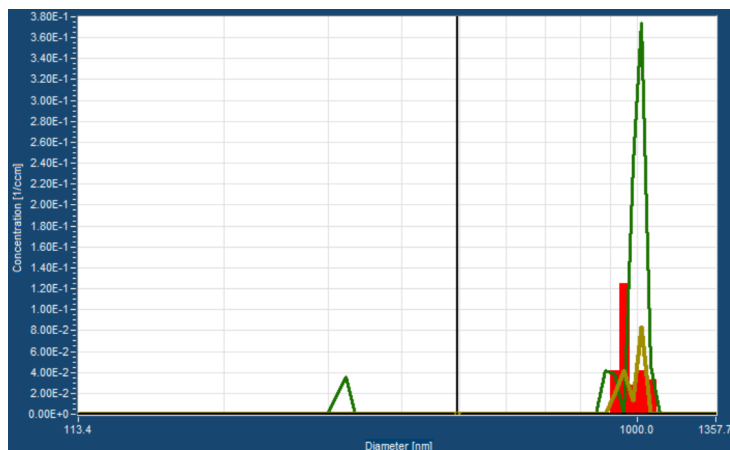
Obrázek 7: 500nm částice z DMA, měření SMPS přístrojem Grimm

Tabulka 1.

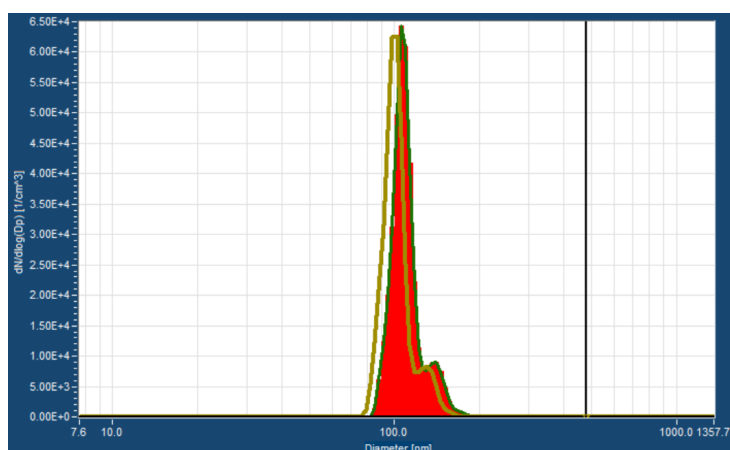
2.4.3. Pylové částice

Dle oficiální specifikace nelze pomocí atomizéru TSI generovat z vodní suspenze aerosol s částicemi o velikostech nad 2 μm (byl předchozí experiment s „peanut“ PSL částicemi ještě fungoval). V takovém případě lze použít např. „suchou“ metodu odsávání částic z rotujícího disku. K tomu na ČMI slouží přístroj TSI Small-Scale Powder Disperser 3433 (Obrázek 12). Takto velké částice také nelze měřit pomocí kondenzačního čítače, a k měřením proto byl použit optický čítač TSI AeroTrak.

Jako příklad měření s reálným polydisperzním aerosolem byl použit vzorek (reálně sesbíraných) pylových částic chmele otáčivého (Obrázek 13). Jeho pylová zrna jsou relativně malá (10-25 μm), a jsou tak stále ještě použitelná ke generování aerosolu, navíc je lze poměrně snadno zakoupit v dostatečném objemu (cca 100 Kč / 20 g). Komerčně pořídit lze také např. pyl konopí setého, ten je však již podstatně nákladnější (řádově 3000 Kč / 150 mg).



Obrázek 8: 1000nm částice z DMA, měření SMPS přístojném Grimm

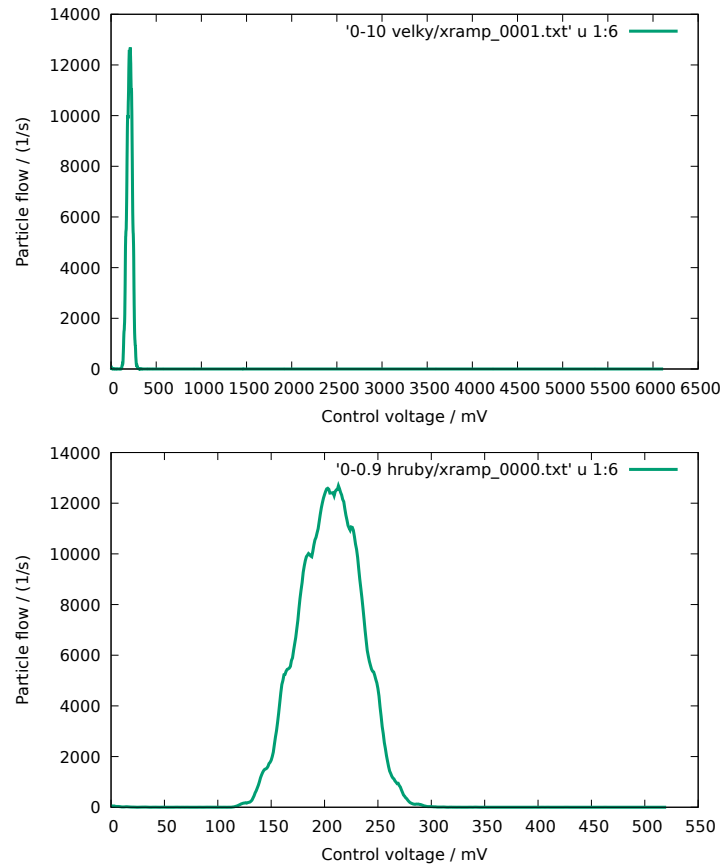


Obrázek 9: Měření 100nm částic s použitím DMA a SMPS Grimm.

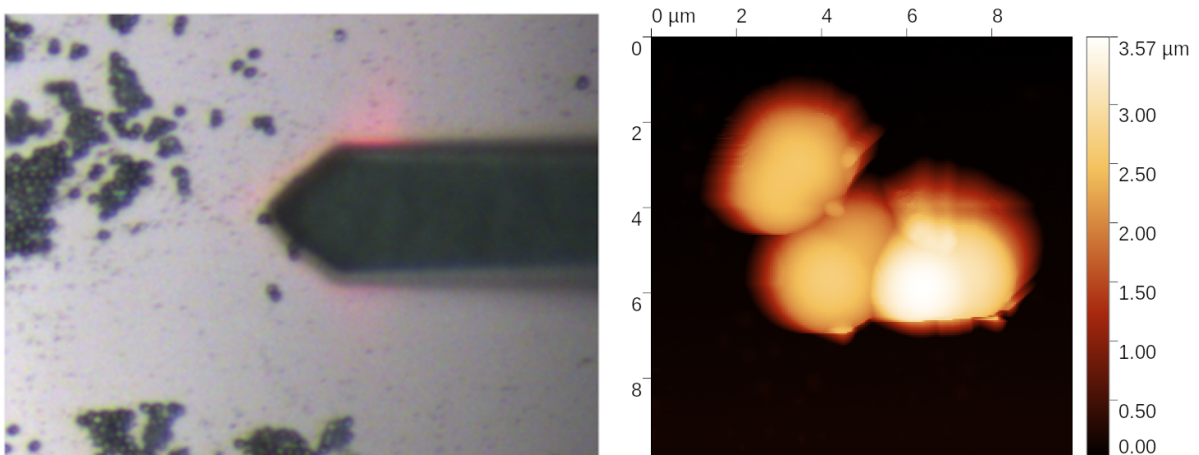
2.4.4. Arizona dust

Jako další příklad měření s reálným polydisperzním aerosolem byl použit standardní vzorek tzv. Arizona dust (výrobce Powder Technology Inc., jedná se skutečně o referenční testovací materiál podle normy ISO 12103-1)¹. Velikostní rozdělení částic specifikované výrobcem ukazuje Obrázek 14. Výsledky měření (bylo provedeno dvoje vzorkování s různými koncentracemi) uvádí Tabulka 3.

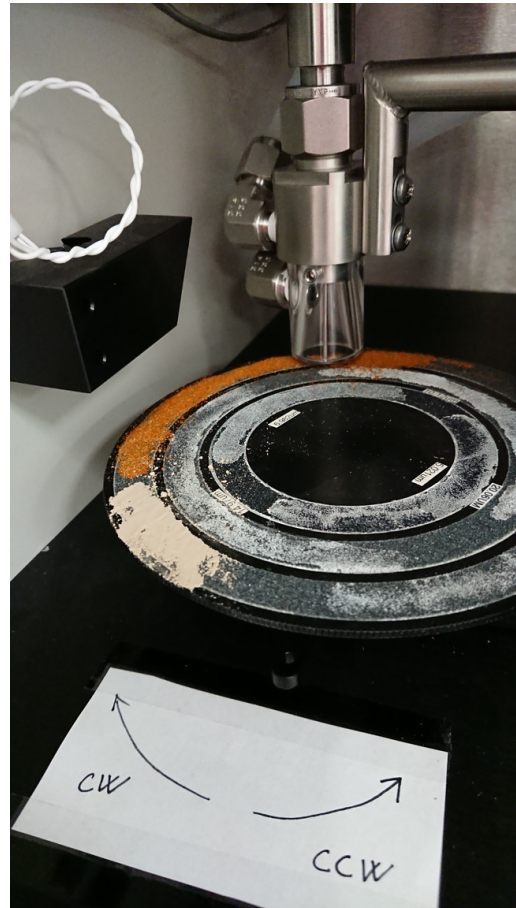
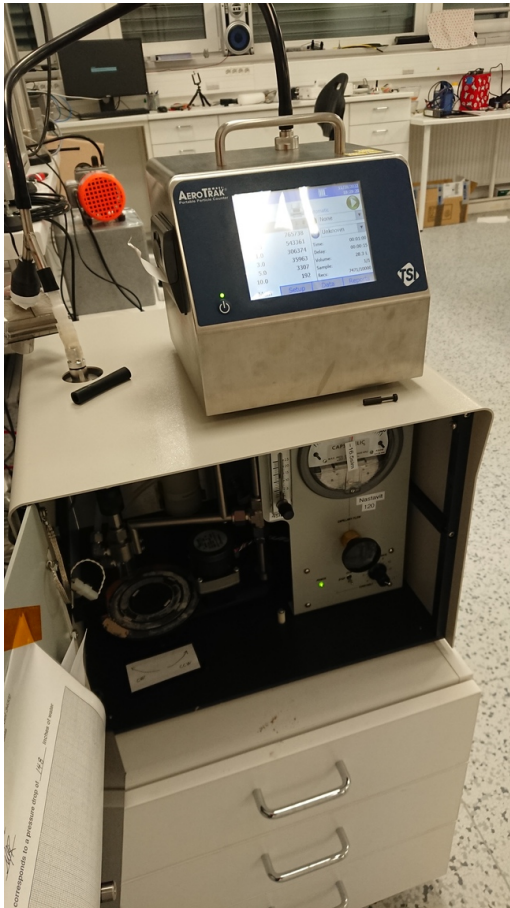
¹Více např. na <https://www.powdertechinc.com/test-dust-contaminants/test-dust-history/>



Obrázek 10: 100nm částice z DMA Grimm, měření SMPS s kondenzačním čítačem TSI. Scan přes velkou část rozsahu (nahore) i detailnější scan v užším rozsahu řídicího napětí (dole) ukazují na aerosol bez přítomnosti dalších částic jiných velikostí.



Obrázek 11: AFM měření nepravidelných PSL částic tvaru „peanut“.



Obrázek 12: Vlevo: generátor aerosolů s velkými částicemi TSI 3433 s optickým čítačem TSI AeroTrak 9310. Vpravo: detail generátoru TSI 3433 se vzorky chmelového pylu (oranžový) a Arizona dust (světlý).

Tabulka 1: Měření nepravidelných PSL částic tvaru „peanut“ přístrojem TSI AeroTrak 9310 (diferenciální počty částic v 1 kubické stopě aerosolu).

Size	$\Delta \# (V_{\min})$	$\Delta \# (V_{\text{mean}})$	$\Delta \# (\text{bez DMA})$
0.3	195	184	3422
0.5	223	70	3518
1.0	1685	1198	22765
3.0	39	19	418
5.0	2	1	3
10.0	0	0	0

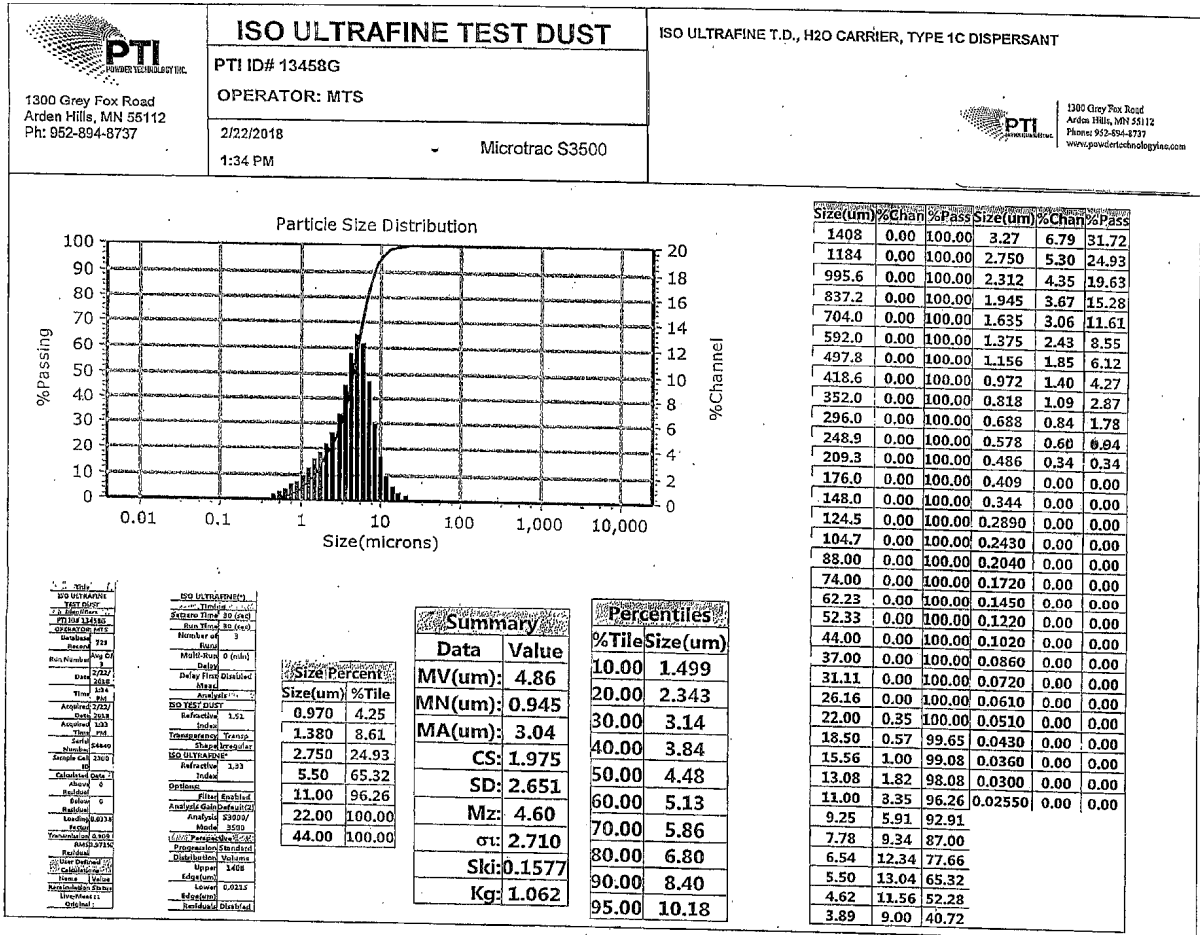


Obrázek 13: Komerčně dostupný pyl chmele otáčivého.

Tabulka 2: Měření pylových zrn chmele otáčivého přístrojem TSI AeroTrak 9310 (diferenciální počty částic v 1 kubické stopě aerosolu).

Size	$\Delta \#$
0.3	222377
0.5	236987
1.0	270411
3.0	32656
5.0	3115
10.0	192

Size	$\Delta \#$
0.3	97850
0.5	113396
1.0	115026
3.0	15215
5.0	2704
10.0	239



Obrázek 14: Rozdělení velikosti částic vzorku Arizona dust (specifikace výrobce).

Tabulka 3: Měření vzorku Arizona dust přístrojem TSI AeroTrak 9310 (diferenciální počty částic v 1 kubické stopě aerosolu)

Size	Δ #	Size	Δ #
0.3	344552	0.3	369587
0.5	338736	0.5	228821
1.0	291138	1.0	163832
3.0	56522	3.0	9445
5.0	11197	5.0	495
10.0	10	10.0	1

	Český metrologický institut Oblastní inspektorát Brno	Zpráva úkolu TR č. 6014-TR-Z0002-22	Počet příloh: 1 Počet listů: 19/24
--	---	---	---------------------------------------

3. DOSAŽENÉ VÝSLEDKY

V rámci řešení úkolu byly prověřeny technické možnosti aerosolové laboratoře ČMI OI Brno, oddělení 6014, pro práci s dalšími druhy aerosolů. Dosaženy byly tyto výsledky:

- Stávající atomizér TSI, používaný ke generování aerosolů při kalibracích optických čítačů částic lze využít i pro částice o velikosti lehce přesahující 2 μm . Stávající systém DMA ani kondenzační čítač však již mimo jejich specifikace spolehlivě provozovat nelze.
- Aerosoly s většími částicemi (pyl, prach) je možné generovat pomocí přístroje TSI Small-scale powder disperser a následně charakterizovat pomocí optického čítače.
- Stávající software ČMI pro řízení SMPS byl upraven a nyní umožňuje přesné odečítání aktuálních dat z kondenzačního čítače TSI, což bylo otestováno na 100nm monodisperzních částicích a větších PSL částicích nepravidelného tvaru.
- Prověření funkčnosti jednotlivých komponent (DMA a kondenzačních čítačů) našich SMPS systémů AVČR+TSI a Grimm potvrdilo jejich spolehlivost a použitelnost v dalším výzkumu a v případě řádné kalibrace i komerční činnosti laboratoře.




4. ČERPANÉ NÁKLADY NA ÚKOL

Tabulka 4: Tabulka plánovaných a čerpaných nákladů (v tis. Kč):

		Plán	Odhad čerpání do 31. 12. 2022
Cena hodin	tis. Kč	340	340
Materiál	tis. Kč	60	60
Externí kooperace	tis. Kč		
Výdaje na porovnání v zahraničí	tis. Kč		
Interní kooperace	tis. Kč		
Kooperující středisko			
Cestovné zahraniční	tis. Kč		
Celkem	tis. Kč	400	400

Většina výdajů byla čerpána formou hodin. Materiál byl použit na úpravy aerosolové aparatury a pořízení drobného vybavení pro provádění experimenty.


	Český metrologický institut Oblastní inspektorát Brno	Zpráva úkolu TR č. 6014-TR-Z0002-22	Počet příloh: 1 Počet listů: 21/24
---	---	---	---------------------------------------

5. ZÁVĚRY

Projekt se zaměřil na nastudování problematiky měření bioaerosolů a realizaci měření specifických druhů mono- i polydisperzních částic biologického původu nebo vhodně simulujících bioaerosoly. K tomu bylo použito vybavení aerosolové laboratoře odd. 6014 ČMI OI Brno. V rámci praktických měření byla získána řada poznatků pro generování, úpravu a měření aerosolů s velkými částicemi.


Vylepšený softwarový nástroj pro řízení SMPS poskytuje lepší možnosti analýzy velikostní distribuce částic v aerosolech (např. detekci nežádoucích reziduí), což může nalézt uplatnění i při provádění kalibrací optických čítačů pomocí monodisperzních aerosolů.

Všechny plánované cíle úkolu byly dosaženy.


	Český metrologický institut Oblastní inspektorát Brno	Zpráva úkolu TR č. 6014-TR-Z0002-22	Počet příloh: 1 Počet listů: 22/24
---	---	---	---------------------------------------

Seznam bibliografických citací

- [1] William C Hinds. *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles*. John Wiley & Sons, 1999.
- [2] Pramod Kulkarni, Paul A Baron, and Klaus Willeke. *Aerosol measurement: principles, techniques, and applications*. John Wiley & Sons, 2011.
- [3] Parker C Reist. *Aerosol science and technology*. 1993.
- [4] Christopher S Cox and Christopher M Wathes. *Bioaerosols handbook*. CRC Press, 1995.
- [5] Michael Muilenberg and Harriet Burge. *Aerobiology*. CRC, Lewis Publishers, 1996.
- [6] Wikipedia contributors. Aerobiology – Wikipedia, the free encyclopedia, 2022. [Online; accessed 14 September 2022].
- [7] Rafał L Górny. Microbial aerosols: sources, properties, health effects, exposure assessment – a review. *KONA Powder and Particle Journal*, page 2020005, 2020.
- [8] Anne-Marie Delort and Pierre Amato. *Microbiology of aerosols*. John Wiley & Sons, 2017.
- [9] Anne Pringle. Asthma and the diversity of fungal spores in air. *PLoS pathogens*, 9(6):e1003371, 2013.
- [10] C Ingold et al. T fungal spores. their libération and dispersal. *T Fungal spores. Their liberation and dispersal.*, 4, 1971.
- [11] Jana Kánská. Inhalátory a aerosoly pro léčbu bakteriálních onemocnění. *Bakalářská práce*, 2022.
- [12] Wikipedia contributors. Virus-like particle – Wikipedia, the free encyclopedia, 2022. [Online; accessed 29 September 2022].
- [13] Małgorzata Jędryczka. *Aeromycology: studies of fungi in aeroplankton*. 2014.
- [14] Wikipedia contributors. Bacteria – Wikipedia, the free encyclopedia, 2022. [Online; accessed 29 September 2022].
- [15] J Robertson, M Gomersall, and P Gill. Mycoplasma hominis: growth, reproduction, and isolation of small viable cells. *Journal of bacteriology*, 124(2):1007–1018, 1975.
- [16] Heide N Schulz and Bo Barker Jørgensen. Big bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1):105–137, 2001.
- [17] Per Jonsson, Göran Olofsson, Torbjörn Tjärnhage, Goran Olofsson, and Torbjorn Tjarnhage. *Bio-aerosol detection technologies*, volume 11. Springer, 2014.
- [18] I Colbeck and Mihalis Lazaridis. *Aerosol Science*. Wiley Online Library, 2014.
- [19] Bipasha Ghosh, Himanshu Lal, and Arun Srivastava. Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms. *Environment international*, 85:254–272, 2015.
- [20] World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*. 2004.

	Český metrologický institut Oblastní inspektorát Brno	Zpráva úkolu TR č. 6014-TR-Z0002-22	Počet příloh: 1 Počet listů: 23/24
---	---	---	---------------------------------------

- [21] A. Sharma, B. Preece, H. Swann, X. Fan, R. J. McKenney, K. M. Ori-McKenney, S. Saffarian, and M. D. Vershinin. Structural stability of sars-cov-2 virus like particles degrades with temperature. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 534:343–346, 2021.
- [22] Leonard F Pease III. Physical analysis of virus particles using electrospray differential mobility analysis. *Trends in biotechnology*, 30(4):216–224, 2012.
- [23] Kuo-Pin Yu, Yen-Ping Chen, Jia-You Gong, Yen-Chi Chen, and Chih-Ching Cheng. Improving the collection efficiency of the liquid impinger for ultrafine particles and viral aerosols by applying granular bed filtration. *Journal of aerosol science*, 101:133–143, 2016.
- [24] Malin Alsved, Lydia Bourouiba, Caroline Duchaine, Jakob Löndahl, Linsey C Marr, Simon T Parker, Aaron J Prussin, and Richard J Thomas. Natural sources and experimental generation of bioaerosols: challenges and perspectives. *Aerosol Science and Technology*, 54(5):547–571, 2020.

	Český metrologický institut Oblastní inspektorát Brno	Zpráva úkolu TR č. 6014-TR-Z0002-22	Počet příloh: 1 Počet listů: 24/24
---	---	---	---------------------------------------

PŘÍLOHY

Příloha č. 1 Kopie plánovacího listu

Číslo úkolu*	Název úkolu	Stručná charakteristika úkolu Výsledek řešení úkolu	Termíny řešení		Neinvestič. prostředky tis. Kč
			zahájení	ukončení	
UTR	Rozvoj metrologie bioaerosolů.	Hlavním cílem úkolu je rozvoj v oblasti metrologie bioaerosolů a obdobných aerosolů skládajících se ze směsi částic s neznámou velikostí.	1/2022	12/2022	400,-
Předkládá: Český metrologický institut Úsek FM, Hvožd'anská 3, Praha 4		Bank. spojení / č. Účtu: 70338-621/0100			
		IČ / DIČ: 00177016 / CZ00177016	Č.j.:		
		Odpovědný řešitel: Mgr. Petr Klapetek, Ph.D.	Došlo :		
		Podpis :	Financující organizace: ČMI		
		Tel. / Fax: 545 555 337 / 545 555 183	Poznámka:		
		Datum : 29. 11. 2021			

PLÁNOVACÍ LIST ÚKOLU TECHNICKÉHO ROZVOJE

1.1 Hlavní cíle úkolu (důvod zadání úkolu, např. zákonné požadavky, plnění koncepce rozvoje NMS, plnění požadavků CIPM MRA):

Hlavním cílem úkolu je rozvoj metrologie aerosolů obsahujících částice s neznámou velikostí, což je jev, se kterým se můžeme setkat například u aerosolů obsahujících virům podobné částice, spory hub či pyl. Této oblasti se naše laboratoř zatím z hlediska generování ani z hlediska měření nevěnovala. Standardně se při kalibraci optických čítačů používají částice o známém rozdělení velikosti, což není případ reálných aerosolů (jak biologického tak průmyslového původu). Tímto rozdílem vzniká nejistota měření (v praxi měříme něco podstatně jiného, než čím přístroj kalibrujeme) a přestože z pohledu normy na kalibraci čítačů částic se taková situace může jevit v pořádku, je důležité vědět jak je tato nejistota velká. Výzkum v této oblasti je důležitý pro všechna pokročilejší měření aerosolů, například pro rozvoj metrologie analyzátorů pylů, které kombinací optických čítačů, fluorescenčních měření a umělé inteligence provádí automatická měření koncentrace různých typů pylů v ovzduší.

Cílem projektu je rozšířit možnosti naší laboratoře směrem k obecnějším aerosolům vyskytujícím se v environmentálních aplikacích. To zahrnuje rozšíření rozsahu generování částic do oblasti pod 300 nm a nad 1 mikrometr, včetně prozkoumání možnosti generování aerosolů s částicemi biologického původu, např. pylů. Dále plánujeme otestovat námi využívané klasifikátory částic a jejich schopnost měřit rozdělení velikostí u monodisperzních i polydisperzních aerosolů v těchto nových oblastech, případně porovnat naměřené velikosti částic s referenční metodou, kterou je mikroskopie atomárních sil a kterou by pro větší částice mohla být i optická mikroskopie.

1.2 Objektivně ověřitelné výsledky řešení úkolu:

Výsledky porovnání klasifikátorů částic.

1.3 Způsob ověření: (uvést neopomenutelné účastníky):

Závěrečná oponentura za účasti oponentů.

1.4 Navrhovaní oponenti úkolu (minimálně 2, podléhají odsouhlasení zadavatelem úkolu):
prof. RNDr. Miloslav Ohlídal, CSc., Mgr. Petr Klenovský, Ph.D.

2.1 Dílčí cíle nezbytné k dosažení hlavních cílů úkolu (I. etapa řešení) :
Generování částic mimo stávající rozsah (pod 300 nm, nad 1 mikrometr).

2.2 Objektivně ověřitelné ukazatele dílčích cílů
Výsledky měření optickými a kondenzačními čítači.

2.3 Způsob ověření dílčích cílů
Průběžná oponentura za účasti oponentů.

3. Kalkulace úkolu (rozpis nákladů) a ekonomické zhodnocení (přínos ekonomický):
odhad jednorázových nákladů (stroje, zařízení, budovy) a odhad nákladů na projekt (pracovní hodiny, materiál, kooperace)

číslo střediska		6014		
č. úkolu	neuvádět			
počet hodin střediska na celý úkol x sazba		234h.x1447Kč=340tis Kč		
materiál	tis. Kč	60		
externí kooperace	tis. Kč	-		
výdaje na porovnání v zahraničí	tis. Kč	-		
interní kooperace	tis. Kč		-	
kooperující středisko			-	
cestovné zahraniční	tis. Kč			
celkem	tis. Kč	400		

4. Zdroj financování úkolu (v %):

100 % hrazeno z ČMI

5. Praktické využití výsledků řešení a požadavky pro udržovatelnost výsledků (včetně vlivu výsledku na životní prostředí):

Přispění k otázkám fundamentální metrologie aerosolových částic a optických čítačů.
Rozšíření rozsahu velikostí částic se kterými může laboratoř pracovat, odhad nejistoty měření při analýze reálných (bio)aerosolů.

6. Spoluřešitelé úkolu (uvést rozsah spolupráce-věcný, finanční):

nejsou

7. Nároky na zahraniční cesty (stát, organizace, délka pobytu, finanční nároky):

nejsou

8. Prohlašujeme, že naše organizace současně nenárokovala, resp. nemá přislíbeny finanční prostředky na řešení úkolu ze státního rozpočtu prostřednictvím jiného orgánu státní správy, popř. nevyužila jiné, duplicitní cesty k financování navrhovaného úkolu.

Název, adresa, razítko a podpis statutárního zástupce:

Český metrologický institut
Okružní 31
638 00 Brno

doc. RNDr. Jiří Tesař Ph.D.
generální ředitel ČMI

Pozn.: Pokud nestačí formulář, je možno příslušný bod rozvést na další přílohu.