



Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava

organizačná zložka

Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV

PREVÁDZKOVÝ PORIADOK PRE PRÁCU S CHEMICKÝMI FAKTORMI

NV SR č. 355/2006 Z. z. o ochrane zamestnancov pred rizikami súvisiacimi
s expozíciou chemickým faktorom pri práci v znení NV SR č. 82/2015

NV SR č. 356/2006 Z. z. o ochrane zdravia zamestnancov pred rizikami súvisiacimi
s expozíciou karcinogénnym a mutagénnym faktorom pri práci v znení NV SR č. 83/2015

**Oddelenie biochémie membrán
Ústav biochémie a genetiky živočíchov CBv SAV**

Dátum	Schválila	Vypracovala
Bratislava, jún 2017	Ing. Zdena Sulová, DrSc. riaditeľka CBv SAV	Gizela Gajdošíková technička BOZP

Obsah

1. Opis pracovných priestorov a ich umiestnenie	3
2. Nebezpečné chemické faktory používané v laboratóriách	10
3. Popis vybraných pracovných činností v laboratóriách, pri ktorých sa používajú vyššie uvedené nebezpečné chemické faktory	16
4. Pravidlá pre prácu s chemickými faktormi v laboratóriách	23
5. Uchovávanie chemických faktorov	23
6. Označovanie chemických faktorov	25
7. Likvidácia chemických faktorov	25
8. Udalosť, nehoda a porušenie pravidiel	25
9. Postup v prípade kontaminácie priestoru rizikovým faktorom	29
10. Ochranné a preventívne opatrenia	29

1. Opis pracovných priestorov a ich umiestnenie

Miestnosti č. 2.05, 2.06, 2.07, 2.08, 2.09, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13, 2.14, 2.15, 2.16, 2.17, 2.18, 2.19, 2.20, 2.21 sa nachádzajú na 2. podlaží budovy súpisné číslo 5788 v areáli SAV na Dúbravskej ceste 9 v Bratislave.

Miestnosť č. 2.05 – Oddychová miestnosť

Miestnosť s vybielenými stenami s prirodzeným osvetlením a vetraním (otvárateľné okná s možnosťou tienenia). Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody a umývadlom v kuchynskej linke. Súčasťou miestnosti sú 2 jedálenské stoly so stoličkami, kuchynská linka, skrinky na odkladanie potravín a chladnička na skladovanie potravín. V miestnosti sa nachádza varná kanvica, varič a mikrovlnná rúra.

Miestnosť slúži na oddych pracovníkov a na jednoduchú prípravu, resp. zohriatie stravy.

Miestnosti č. 2.06, 2.07, 2.08, 2.09, 2.10, 2.11 – Pracovne zamestnancov a doktorandov

Všetky pracovne majú vybielené steny. Sú to miestnosti s prirodzeným osvetlením a vetraním (otvárateľné okná s možnosťou tienenia). Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Podlaha je pokrytá kobercom. Sú to miestnosti s prívodom vody a umývadlom na osobnú hygienu pracovníkov.

Pracovne sú vybavené: pracovnými stolmi, kancelárskymi stoličkami, skriňovou zostavou, PC s LCD monitorom.

Na pracovisku sa vykonáva administratívna práca spojená s prácou so zobrazovacou jednotkou, ktorá predstavuje významnú časť pracovnej doby s možnosťou prerušenia práce.

Miestnosť č. 2.12 - Umyváreň skla so zariadením na výrobu ľadu a deionizovanej vody

Miestnosť má kachličky na stenách do výšky 180 cm. Miestnosť je s prirodzeným osvetlením a vetraním (otvárateľné okná). Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody a drezom na umývanie laboratórneho skla.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Vybavenie pracoviska

Pracovisko je vybavené pracovnými laborátornými stolmi s umývateľným povrchom so skrinkami pod pracovnou plochou. Súčasťou miestnosti je drez na umývanie laboratórneho skla. Nad stolmi sú poličky a skrinky na príručné roztoky a pracovné pomôcky.

Prístrojové vybavenie pracoviska pozostáva zo zariadenia na prípravu deionizovanej vody, zariadenia na prípravu ľadu, autoklávov a laboratórných váh. Zariadenie je doplnené bežnými drobnými laborátornými pomôckami.

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do **kategórie CHF – 2**.

Miestnosť č. 2.13 – Prístrojové laboratórium

Miestnosť s umývateľnými stenami do výšky 160 cm s prirodzeným osvetlením a vetraním (otvárateľné okná s možnosťou tienenia). Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Umelé vetranie zabezpečuje klimatizačná jednotka s možnosťou nastavenia teploty v miestnosti. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody a umývadlom.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Je to pracovisko so zvýšeným nebezpečenstvom vzniku požiaru.

Vybavenie pracoviska

Laboratórium je vybavené pracovnými laborátornými stolmi na ktorých sú umiestnené laborátorne prístroje k jednotlivým metodikám so skrinkami pod pracovnou plochou. Súčasťou miestnosti je umývadlo. V laboratóriu sú umiestnené chladničky a mrazničky na skladovanie pracovných roztokov, chemikálií, vzoriek a pod. V miestnosti sa nachádza skriňa na skladovanie chemikálií a protipožiarna skriňa na skladovanie horľavých chemikálií. Nad stolmi sú poličky a skrinky na príručné roztoky a pracovné pomôcky. V úložných priestoroch je uskladnené laborátorne sklo, plasty, pomôcky, na policiach uprostred stola bežné chemikálie, pracovné roztoky a pod.

Prístrojové vybavenie laboratória pozostáva zo zostavy pre HPLC; plynového chromatografu; spektrofluorimetra; spektrofotometra. Zariadenie je doplnené bežnými drobnými laborátornými prístrojmi a pomôckami ako sú automatické pipety, vortex a stolová centrifúga.

V laboratóriu sa manipuluje s niektorými nebezpečnými chemickými látkami v kvapalnej podobe potrebných pre HPLC. Používané objemy sa pohybujú v desiatkach až stovkách ml.

V miestnosti sa nachádzajú plynové tlakové fľaše: Vodík (1x), Argón (1x), stlačený vzduch (1x).

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do **kategórie CHF – 2**.

Miestnosť č. 2.14 – Miestnosť s hlbokomraziacim boxom a ultracentrifúgou

Miestnosť s umývateľnými stenami s prirodzeným osvetlením a vetraním (otvárateľné okná s možnosťou tienenia). Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Umelé vetranie zabezpečuje klimatizačná jednotka s možnosťou nastavenia teploty v

miestnosti. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou krytinou z PVC. Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Vybavenie pracoviska

Laboratórium je vybavené pracovnými laboratórnymi stolmi na ktorých sú umiestnené laboratórne prístroje k jednotlivým metodikám so skrinkami pod pracovnou plochou. Nad stolmi sú skrinky na príručné roztoky a pracovné pomôcky.

Prístrojové vybavenie laboratória pozostáva z ultracentrifúgy, hlbokomraziaceho boxu, pultovej mrazničky a kompresora pre prípravu dusíka pre HPLC. Zariadenie je doplnené bežnými drobnými laboratórnymi prístrojmi a pomôckami.

V hlbokomraziacom boxe sú skladované biologické kultúry kvasiniek, kvasinkových mikroorganizmov a laboratórných kmeňov *Escherichia coli*.

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do **kategórie CHF – 2**.

Miestnosť č. 2.15 – Biochemické laboratórium

Miestnosť s umývateľnými stenami do výšky 160 cm s prirodzeným osvetlením a vetraním (otvárateľné okná s možnosťou tienenia). Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Umelé vetranie zabezpečuje vzduchotechnika s možnosťou nastavenia teploty v miestnosti. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody a umývadlami v laboratórnom stole.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Je to pracovisko so zvýšeným nebezpečenstvom vzniku požiaru.

Vybavenie pracoviska

V strede miestnosti sa nachádza obojstranný laboratórny stôl s umývateľným povrchom, pripojený na rozvod teplej a studenej vody. Súčasťou tohto laboratórneho stola sú dva chemické drezy. Laboratórium je ďalej vybavené pracovnými laboratórnymi stolmi prístrojovými s umývateľným povrchom so skrinkami pod pracovnou plochou. V miestnosti sa nachádza **chemický digestor** so skrinkou na kyseliny a lúhy. V laboratóriu sú umiestnené chladničky a mrazničky na skladovanie pracovných roztokov, chemikálií, vzoriek a pod. V miestnosti sa nachádza skriňa na skladovanie chemikálií a 2 odsávané protipožiarne skrine na skladovanie horľavých organických chemikálií. V laboratóriu sa nachádza tiež uzamykateľná skrinka na toxické a veľmi toxické látky a zmesi. Nad stolmi sú poličky a skrinky na príručné roztoky a pracovné pomôcky. V úložných priestoroch je uskladnené laboratórne sklo, plasty, pomôcky, na policiach uprostred stola bežné chemikálie, pracovné roztoky a pod.

Prístrojové vybavenie laboratória pozostáva zo zostavy pre TLC (nanášacie a vyhodnocovacie zariadenie); dezintegrátora buniek, inkubátorov, vodných kúpelov, termostatu. Zariadenie je doplnené bežnými drobnými laboratórnymi prístrojmi a pomôckami ako sú automatické pipety, vortex a stolová centrifúga.

V laboratóriu sa manipuluje s niektorými nebezpečnými chemickými látkami v kvapalnej podobe potrebných pre TLC. Používané objemy sa pohybujú v desiatkach až stovkách ml.

V miestnosti sa nachádzajú plynové tlakové fľaše: Dusík (2x).

V laboratóriu sa pracuje aj s rádioaktívnymi látkami značenými izotopmi ^3H , ^{32}P a ^{14}C . Ich celkové množstvo v držbe jednej osoby pri práci v ľubovoľnom čase však neprevyšuje $1 \times 10^9 \text{ Bq}$ (27 mCi) pre ^3H , 10^5 Bq (2,7 μCi) pre ^{32}P a $1 \times 10^7 \text{ Bq}$ (0,27 mCi) pre ^{14}C .

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do **kategórie CHF – 2**.

Miestnosť č. 2.16 – Mikrobiologické laboratórium

Miestnosť s umývateľnými stenami do výšky 160 cm s prirodzeným osvetlením a vetraním (otvárateľné okná s možnosťou tienenia). Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Umelé vetranie zabezpečuje vzduchotechnika s možnosťou nastavenia teploty v miestnosti. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody a umývadlami v laboratórnom stole.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Je to pracovisko so zvýšeným nebezpečenstvom vzniku požiaru.

Vybavenie pracoviska

V strede miestnosti sa nachádza obojstranný laboratórny stôl s umývateľným povrchom, pripojený na rozvod teplej a studenej vody. Súčasťou tohto laboratórneho stola sú dva chemické drezy. Laboratórium je ďalej vybavené pracovnými laboratórnymi stolmi prístrojovými s umývateľným povrchom so skrinkami pod pracovnou plochou. V miestnosti sa nachádza **chemický digester** so skrinkou na kyseliny a lúhy. V laboratóriu sú umiestnené chladničky a mrazničky na skladovanie pracovných roztokov, chemikálií, vzoriek a pod. V miestnosti sa nachádza uzamykateľná chladnička na skladovanie toxických látok. V miestnosti sa nachádzajú 2 odsávané protipožiarne skrine na skladovanie horľavých chemikálií. Nad stolmi sú poličky a skrinky na príručné roztoky a pracovné pomôcky. V úložných priestoroch je uskladnené laboratórne sklo, plasty, pomôcky, na policiach uprostred stola bežné chemikálie, pracovné roztoky a pod.

Prístrojové vybavenie laboratória pozostáva z anaeróbneho boxu s príslušenstvom na prípravu striktno anaeróbnych podmienok, sterilného laminárneho boxu, inkubátorov, vodného kúpeľa, centrifúgy, termostatu, zariadenia na gelovú elektroforézu proteínov.

Zariadenie je doplnené bežnými drobnými laboratórnymi prístrojmi a pomôckami ako sú automatické pipety, vortex a stolová centrifúga.

V laboratóriu sa manipuluje s niektorými nebezpečnými chemickými látkami v kvapalnej podobe potrebných pre TLC a gelovú elektroforézu proteínov. Používané objemy sa pohybujú v desiatkach až stovkách ml.

V laboratóriu sa manipuluje s biologickým materiálom kvasiniek, kvasinkových mikroorganizmov a laboratórných kmeňov *Escherichia coli*.

V miestnosti sa nachádzajú plynové tlakové fľaše: Dusík (2x).

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do **kategórie CHF – 2**.

Miestnosť č. 2.17 – Laboratórium bunkovej biológie

Miestnosť s umývateľnými stenami do výšky 160 cm s prirodzeným osvetlením a vetraním (otvárateľné okná s možnosťou tienenia). Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody a umývadlami v laboratórnom stole.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Vybavenie pracoviska

V strede miestnosti sa nachádza obojstranný laboratórny stôl s umývateľným povrchom, pripojený na rozvod teplej a studenej vody. Súčasťou tohto laboratórneho stola sú dva chemické drezy. Laboratórium je ďalej vybavené pracovnými laboratórnymi stolmi prístrojovými s umývateľným povrchom so skrinkami pod pracovnou plochou. V laboratóriu sú umiestnené chladničky a mrazničky na skladovanie pracovných roztokov, chemikálií, vzoriek a pod. Nad stolmi sú poličky a skrinky na príručné roztoky a pracovné pomôcky. V úložných priestoroch je uskladnené laboratórne sklo, plasty, pomôcky, na policiach uprostred stola bežné chemikálie, pracovné roztoky a pod.

Prístrojové vybavenie laboratória pozostáva zo sterilného laminárneho boxu, inkubátorov, vodného kúpeľa, centrifúgy, termostatu, PCR zariadenia, RT-PCR a zariadenia na gelovú elektroforézu nukleových kyselín spolu s UV detekčným zariadením. Zariadenie je doplnené bežnými drobnými laboratórnymi prístrojmi a pomôckami ako sú automatické pipety, vortexy a stolové centrifúgy.

V laboratóriu sa manipuluje s niektorými nebezpečnými chemickými látkami v kvapalnej a tuhej podobe (inhibítory a liečivá) s veľmi nízkou koncentráciou nebezpečnej chemickej látky (mg/ml, µg/ml) a používané množstvá na manipuláciu sa pohybujú v µl, resp. ml objemoch. U tuhých látok spravidla maximálne v mg množstvách.

V laboratóriu sa manipuluje s biologickým materiálom kvasiniek, kvasinkových mikroorganizmov a laboratórných kmeňov *Escherichia coli*.

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do **kategórie CHF – 2**.

Miestnosť č. 2.18 – Sterilný box

Miestnosť s umývateľnými stenami do výšky 160 cm s prirodzeným osvetlením a vetraním (otvárateľné okná s možnosťou tienenia). Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Miestnosť je sterilizovateľná zabudovanou germicídnu lampou. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody a umývadlom. V úložných priestoroch je uskladnené laboratórne sklo, plasty, pomôcky, na policiach uprostred stola bežné chemikálie, pracovné roztoky a pod.

V laboratóriu sa manipuluje s niektorými nebezpečnými chemickými látkami v kvapalnej a tuhej podobe (inhibítory a liečivá) s veľmi nízkou koncentráciou nebezpečnej chemickej látky (mg/ml, µg/ml) a používané množstvá na manipuláciu sa pohybujú v µl, resp. ml objemoch. U tuhých látok spravidla maximálne v mg množstvách.

V laboratóriu sa manipuluje s biologickým materiálom kvasiniek, kvasinkových mikroorganizmov a laboratórnych kmeňov *Escherichia coli*.

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Miestnosť č. 2.19 – Kultivačná komora

Miestnosť s umývateľnými stenami bez prirodzeného osvetlenia a vetrania. Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Vetranie miestnosti je zabezpečené vetracími otvormi v dverách. Je temperovaná na 30°C pre potreby kultivácie kvasinkových mikroorganizmov.

Laboratórium je vybavené pracovnými laboratórnymi stolmi na ktorých sú umiestnené zariadenia na kultiváciu mikroorganizmov so skrinkami pod pracovnou plochou. Nad stolmi sú skrinky na pracovné pomôcky.

V kultivačnej komore sa množia geneticky modifikované mikroorganizmy (kvasinky, kvasinkové mikroorganizmy a laboratórne kmene *Escherichia*) zaradené v rizikovej triede RT1.

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu, pracovníci sa zdržiavajú v kultivačnej miestnosti minimálny čas, najviac niekoľko minút za deň, ich činnosť je obmedzená na prinesie a odnesenie mikrobiálnych kultúr.

Miestnosť č. 2.20 – Laboratórium biosenzorov

Miestnosť s kachličkami na stenách do výšky 180 cm s prirodzeným osvetlením a vetraním (otvárateľné okná s možnosťou tienenia). Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou antistatickou krytinou. Je to miestnosť s prívodom vody a umývadlom.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Vybavenie pracoviska

Laboratórium je vybavené pracovnými laboratórnymi stolmi s umývateľným povrchom so skrinkami pod pracovnou plochou. Nad stolmi sú skrinky na príručné roztoky a pracovné pomôcky. Súčasťou laboratórneho stola je chemický drez. V laboratóriu sa nachádza skriňa na kyseliny a lúhy. Zariadenie je doplnené skriňami na chemikálie, pracovné roztoky a pomôcky. V úložných priestoroch je uskladnené laboratórne sklo, plasty, pomôcky, na policiach uprostred stola bežné chemikálie, pracovné roztoky a pod.

V miestnosti sa nachádza laminárny box, presné váhy, centrifúga a chladnička.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do **kategórie CHF – 2**.

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

Miestnosť č. 2.21 – Laboratórium biosenzorov

Miestnosť s kachličkami na stenách do výšky 180 cm s prirodzeným osvetlením a vetraním (otvárateľné okná s možnosťou tienenia). Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody a umývadlom.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Vybavenie pracoviska

Laboratórium je vybavené pracovnými laboratórnymi stolmi s umývateľným povrchom so skrinkami pod pracovnou plochou. Nad stolmi sú skrinky na príručné roztoky a pracovné pomôcky. Súčasťou laboratórneho stola je chemický drez. V laboratóriu sa nachádza skriňa na toxické a veľmi toxické látky a zmesi. Zariadenie je doplnené skriňami na chemikálie, pracovné roztoky a pomôcky. V úložných priestoroch je uskladnené laboratórne sklo, plasty, pomôcky, na policiach uprostred stola bežné chemikálie, pracovné roztoky a pod.

V miestnosti sa nachádza chladnička s mrazničkou, inkubátor a mikroskop.

Laboratória 2.20 a 2.21 sú využívané na prípravu biosenzorov a biologického materiálu pre testovanie týchto biosenzorov.

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

2. Nebezpečné chemické faktory používané v laboratóriách

V zmysle Posudku o riziku pri práci s NCHF, ktorý je neoddeliteľnou súčasťou tohto prevádzkového poriadku, sú pracovné činnosti v našich laboratóriách z hľadiska expozície NCHL zaradené do **kategórie 2**, čo predstavuje únosnú mieru zdravotného rizika.

Rozdelenie NCHF

Veľmi toxické látky (H300, H310, H330)

aflatoxín M1 (oral., inh., derm., kat. 2), aflatoxin B1 (oral., derm., kat. 1, inhal., kat. 2), azid sodný (derm., kat. 1, oral., kat. 2), cykloheximid (oral., kat. 2), digitonin (inh., kat. 2), etidumbromid (inh., kat. 2), kyanoborohydrid sodný (oral., inh., derm., kat. 2), 2-merkptoetanol (derm., kat. 2), kyselina chromsírová (inhal., kat.2)

Toxické látky (H301, H311, H331)

Adenín (oral., kat. 3), akrylamid (oral., kat. 3), CCCP (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (oral., derm., inh., kat. 3), digitonin (derm., oral., kat. 3), formaldehyd (kat. 3), fenol (oral., derm., inh., kat. 3), fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF) (oral., kat. 3), chloroform (inh., kat.3), ketokonazol (oral., kat. 3), kyselina chromsírová (oral. kat. 2), metanol (oral., derm., inh., kat. 3), myriocín (oral., kat. 3), sulfid sodný (oral., derm., kat. 3), trietylamín (derm., inh., kat. 3),

Mutagénne látky (H340, H341)

cykloheximid (kat.2), fenol (kat.2), formaldehyd (kat.2), akrylamid (kat.1B), etidumbromid (kat. 2), síran nikelnatý (kat. 2), kyselina chromsírová (kat. 1B)

Karcinogénne látky (H350, H351)

aflatoxín B1 (kat. 1B), aflatoxín M1 (kat. 1B), formaldehyd (kat. 1B), chloroform (kat. 2), akrylamid (kat. 1B), 1,4-dioxán (kat. 2), naftalén (kat. 2), dehydroergosterol (kat. 2), kyselina chromsírová (kat. 1A), paraformaldehyd (kat. 2), síran nikelnatý (inhal., kat. 1A), trypan blue (kat.1B),

Reprodukčne toxické látky (H360, H361)

akrylamid (kat. 2), cykloheximid (kat. 1B), chloroform (kat. 2), hexán (kat. 2), imidazol (kat. 1B), kanamycín (kat. 1B), ketokonazol (kat. 1B), kyselina boritá (kat. 1B), síran nikelnatý (kat. 1B), kyselina chromsírová (kat. 2), N,N-dimetylformamid (kat. 1B),

Karcinogény:

Kategória 1: Známe alebo pravdepodobné ľudské karcinogény

Kategória 1A: látka, o ktorej je známe, že má karcinogénny potenciál pre ľudí a klasifikácia vo veľkej miere vychádza z dôkazov u ľudí.

Kategória 1B: látka, o ktorej sa predpokladá, že má karcinogénny potenciál pre ľudí a klasifikácia vo veľkej miere vychádza z dôkazov u zvierat.

Kategória 2: Podozrivé ľudské karcinogény

Mutagény:

Kategória 1: Látky, o ktorých sa vie, že vyvolávajú dedičné mutácie v ľudských zárodočných bunkách.

Kategória 1A: Látky, ktoré sa posudzujú tak, ako keby vyvolávali dedičné mutácie v ľudských zárodočných bunkách.

Kategória 1B: Klasifikácia vychádza z: pozitívneho výsledku (výsledkov) testov in vivo dedičnej mutagenity zárodočných buniek cicavcov alebo z pozitívneho výsledku (výsledkov) testov in vivo mutagenity somatických buniek cicavcov, v kombinácii s niektorými dôkazmi o tom, že látka má potenciál spôsobovať mutácie zárodočných buniek. Tieto podporné dôkazy je možné odvodiť z testovania mutagenity/genotoxicity zárodočných buniek in vivo alebo preukázaním schopnosti látky alebo jej metabolitu (metabolitov) interagovať s genetickým materiálom zárodočných buniek alebo z pozitívnych výsledkov testov, ktoré preukazujú mutagénne účinky v ľudských zárodočných bunkách, bez dôkazu prenosu na potomstvo; napríklad zvýšenie frekvencie aneuploidie v mužských pohlavných bunkách exponovaných ľudí.

Kategória 2: Látky, ktoré vyvolávajú u ľudí obavy, pretože môžu vyvolať dedičné mutácie v ľudských zárodočných bunkách.

Reprodukčne toxické látky:

Kategória 1 : látka známa ako toxická pre ľudskú reprodukciu alebo látka, u ktorej sa táto toxicita predpokladá.

Kategória 1A: látka známa ako toxická pre ľudskú reprodukciu - klasifikácia látky vo veľkej miere vychádza z dôkazov od ľudí.

Kategória 1B: látka s predpokladanou toxicitou pre ľudskú reprodukciu - klasifikácia látky vo veľkej miere vychádza z údajov zo štúdií o zvieratách.

Kategória 2: látka podozrivá ako toxická pre ľudskú reprodukciu.

S uvedenými látkami sa pracuje v miestnostiach 2.12 (Umývarka), 2.13 (Prístrojové laboratórium), 2.15 (Biochemické laboratórium), 2.16 (Mikrobiologické laboratórium), 2.17 (Laboratórium bunkovej biológie), 2.18 (Sterilný box), 2.19 (Kultivačná komora), 2.20 (Laboratórium biosenzorov) a 2.21 (Laboratórium biosenzorov). Vymedzený kontrolovaný priestor (digestor, laboratórny stôl, laminárny box), v ktorom sa fyzicky pracuje s karcinogénnymi a mutagénnymi látkami je označený.

Na pracovisku sa pracuje aj s rádioaktívnymi látkami značenými izotopmi ^3H , ^{32}P a ^{14}C . Ich celkové množstvo v držbe jednej osoby pri práci v ľubovoľnom čase však neprevyšuje $1 \times 10^9 \text{ Bq}$ (27 mCi) pre ^3H , 10^5 Bq (2,7 μCi) pre ^{32}P a $1 \times 10^7 \text{ Bq}$ (0,27 mCi) pre ^{14}C . Pre prácu s rádioaktívnymi izotopmi je vypracovaný samostatný prevádzkový poriadok.

Zoznam pracovníkov exponovaných karcinogénnymi a mutagénnymi látkami

RNDr. Peter Griač, CSc.,	vedúci oddelenia
Mgr. Silvia Bágeľová Poláková, PhD.,	samostatná vedecká pracovníčka
Mgr. Alexandra Poturnayová, PhD.,	samostatná vedecká pracovníčka
RNDr. Lenka Bábellová, PhD.,	samostatná vedecká pracovníčka
Mgr. Zsigmond Benkő, PhD,	samostatný vedecký pracovník
Mgr. Martin Valachovič, PhD.,	samostatný vedecký pracovník
RNDr. Dana Tahotná, CSc.,	vedecká pracovníčka
Mgr. Mária Balážová, PhD.,	vedecká pracovníčka
Mgr. Martina Garaiová, PhD.,	vedecká pracovníčka
Mgr. Zuzana Pevalová, PhD.,	vedecká pracovníčka
Mgr. Veronika Virčíková,	doktorandka
Ing. Lucia Pokorná,	doktorandka
Ing. Zsófia Csáky,	doktorandka
Mgr. Ivana Mišová,	doktorandka
Mgr. Dominika Čimborová,	doktorandka
Mgr. Marek Pápay,	doktorand
Marta Kostolanská,	laborantka
Petronela Melicherová,	laborantka
Katarína Nagyová,	laborantka

Množstvo používaných CMR, toxických a veľmi toxických látok

Látka/zmes	Koncentrácia	Dávkované objemy	Mesačná spotreba	Ročná spotreba
2-merkaptoetanol	100%	20 µl	0,2 ml	2 ml
cykloheximid	prášková substancia 1% roztok	40 µg 50 µl	40 µg 50 µl	1 mg 250 µl
azid sodný	prášková substancia 0,1%	1 mg 50 µl	1 mg 50 µl	10 mg 0,5 ml
Kyanoborohydrid sodný	prášková substancia 1M roztok	20 µl	100 µl	1,2 ml
digitonín	kryštalická substancia 1% roztok	10 mg 1 ml	10 mg 1ml	20 mg 2 ml
Aflatoxin B1	20 µg/ml	5 µl	100 µl	1,2 ml
Aflatoxin M1	10 µg/ml	5 µl	100 µl	1,2 ml
etidumbromid	prášková substancia 10 mg/ml	10 mg 10 µl	10 mg 10 µl	10 mg 30 µl
akrylamid	prášková subst. 40% roztok	20 g 50 ml	20 g 50 ml	40 g 100 ml
CCCP	Prášková substancia 100 mM	20 mg 0,8 ml	20 mg 0,8 ml	100 mg 4 ml
formaldehyd	37%	1 ml	1 ml	10 ml
fenol	100%	50 ml	50 ml	100 ml
N,N dimetylformamid	100%	20 µl	50 µl	500 µl
Fenylmetylsulfonyl fluorid	Prášková substancia 100 mM	35 mg 1 ml	35 mg 1 ml	400 mg 11,5 ml
glutaraldehyd	1 ml 25%	50 µl	0,1ml	1 ml
chloroform	100%	70 ml	2 L	20 L
metanol	100%	100 ml	4 L	40 L

ketokonazol	prášková substancia 1 mg/ml	320 µg 200 µl	320 µg 200 µl	500 µg 300 µl
Sulfid sodný	prášková substancia 3 mg/ml	10-40 ul	3 mg	30 mg
paraformaldehyd	Prášková substancia	1 g	1g	10 g
trietylamín	100%	ml	150 ml	1 L
adenín	Prášková substancia	mg	2 g	20 g
myriocín	prášková substancia 2 mg/ml	1 mg 500 µl	1 mg 500 µl	2 mg 1 ml
kyselina boritá	1,8 %	g	1,8 g	9 g
dehydroergosterol	prášková substancia	10 mg	10 mg	100 mg
1,4-dioxán	100%	1 L	1 L	2 L
Naftalén	Prášková substancia	60 g	60 g	120 g
Petroleter	100 %	50 ml	100 ml	5 L
Hexán	100%	100 ml	400 ml	3 L
Imidazol	prášková substancia 1M roztok	8,5 g 5 ml	8,5g 5 ml	15 g 12 ml
digitonín	prášková substancia 0,1%	1 mg 50 µl	1 mg 50 µl	4 mg 200 µl
Kanamycín	prášková substancia 50 mg/ml	50 mg 100 µl	150 mg 3 ml	1,5 g 30 ml
Trypan blue	100 ml 0,4% roztok	50 µl	5 ml	50 ml
Síran nikelnatý	Prášková substancia 100 mM	0,26 g 10 ml	0,26 g 10 ml	2,63 g 100 ml

Pracovníci si denný čas expozície toxickými, veľmi toxickými, karcinogénnymi, mutagénnymi a reprodukčne toxickými látkami zapisujú do svojho osobného zošita s názvom „Záznam o expozícii zamestnanca NCHL“. Tento zošit podlieha archivácii 40 rokov po skončení práce.

Práce s NCHL vedie odborne spôsobilá osoba s platným osvedčením o odbornej spôsobilosti na prácu s toxickými a veľmi toxickými látkami. Osoba, ktorá vlastní platné osvedčenie o odbornej spôsobilosti na prácu s toxickými a veľmi toxickými látkami a zmesami:

- RNDr. Dana Tahotná, CSc. – číslo osvedčenia: OOD/8223 /2016

3. Popis vybraných pracovných činností v laboratóriách, pri ktorých sa používajú vyššie uvedené nebezpečné chemické faktory

Laboratórium biosenzorov – miestnosti 2.20 a 2.21

Aminofunkcionalizácia AFM hrotov, sklíčok, sľudy:

Do exikátora vložíme AFM hroty, sklíčka alebo sľudu v petriho miskách, pridáme v ependorfke 60 μ l APTES (triaminopropyltriethoxysilan) a 20 μ l trietylamínu. Uzavrieme exikátor a nasýtime ho inertným plynom (dusík alebo argón). Po dvoch hodinách ependorfky s chemikáliami vyberieme, exikátor uzavrieme a opäť nasýtime inertným plynom na 48 hodín.

Funkcionalizácia AFM hrotov:

Po aminofunkcionalizácii hrotov nasleduje proces modifikácie funkčnými skupinami. Rozpustíme flexibilný linker napríklad Acetal-PEG-NHS (1mg) v chloroforme (0.5 mL) a prenieseme roztok do teflónovej reakčnej komôrky, k roztoku pridať 30 μ L trietylamínu a premiešame. Okamžite vložíme nosníky do komôrky, zakryjeme a inkubujeme 2 hodiny. Premyjeme v chloroforme (3x10 min), vysušíme s dusíkom. Uskladníme nosníky v argóne pre dlhodobé uskladnenie niekoľko mesiacov, alebo pokračujeme ďalšími krokmi modifikácie. Ponoríme nosníky na 10 min do 1% kyseliny citrónovej. Následne premyjeme vo vode (3x5 min), vysušíť dusíkom. Pripravíme 1 M roztok kyanobórhydridu sodného (s 20 mM NaOH) (musí byť čerstvý) nasledovne: 13 mg NaCNBH₃ (alebo 32 mg); 20 μ L 100mM NaOH (alebo 50 μ L); 180 μ L voda (alebo 450 μ L). Hroty uložíme na parafilm v petriho miske a pridáme 10 μ L proteínového roztoku (1-2 μ M) na nosník. Pridáme 2 μ L 1M roztoku kyanobórhydridu sodného, premiešame zľahka pipetou, zakryjeme sklíčkom, inkubujeme 1 hodinu. Medzitým rozpustíme NaOH v 500mL vody, pridáme nepoužitý NaCNBH₃ roztok, premiešame a vylejeme, opláchneme vodou. Nakoniec k hrotom pridáme 5 μ L etanolamínu (1M, pH 8.0), premiešame, zakryjeme sklíčkom, inkubujeme 10 min. Premyjeme v PBS (3x5min). Nakoniec inkubujeme 100 μ L 1 μ M aptaméru 1-2 hod (aj cez noc). Premyté hroty použijeme na meranie alebo uskladníme v 24 jamkových platničkách v PBS v 4 °C 1-2 týždne.

Príprava zahŕňa prácu s nebezpečnými faktormi (chloroform, trietylamín, kyanoborohydrid sodný), preto vyžaduje striktné dodržiavanie bezpečnostných opatrení a používanie osobných ochranných pomôcok. K expozícii dochádza po dobu maximálne 5 minút počas prípravy roztokov a vzoriek. Metodika sa robí priebežne, približne 1-krát za týždeň. Roztoky

a oplachy obsahujúce nebezpečné látky sú zlievané do označených nádob, uskladnené a likvidované špecializovanou firmou.

Príprava senzora pre detekciu aflatoxínu B1 alebo M1:

Na QCM elektródu, na ktorej je imobilizovaný 1uM aptamér pre detekciu príslušného mykotoxínu inkubujeme zodpovedajúcu koncentráciu aflatoxínu. Elektródu použijeme na TSM alebo AFM meranie.

Testovanie viability buniek:

Na zistenie životaschopnosti buniek používame farbenie trypanovou modrou a priamym počítaním buniek v Burkerovej komorke. Pomer buniek 1:1 (50 µL : 50 µL).

Fixovanie buniek na povrchu:

Na fixáciu buniek používame 4% roztok paraformaldehydu, metanol alebo 0,5% glutaraldehyd. Inkubačné časy a objemy roztokov závisia od typu použitej bunkovej línie.

Laboratórium biogenézy membrán

Kultivácia kvasiniek – miestnosti 2.16, 2.17, 2.18, 2.19:

Na kultiváciu kvasiniek sa používajú bohaté média (peptón, kvasničný autolyzát, glukóza) a definované syntetické média (YNB) s prídavkom síranu amónneho a esenciálnych aminokyselín (adenín, uracil, histidín, leucín, tryptofán, metionín). Aminokyseliny sú v priebehu rastu metabolizované kvasinkami. Použité média a kultúry kvasiniek sú likvidované autoklávaním. Metodika sa používa bežne, 2-3 krát do týždňa.

Anaeróbna kultivácia - miestnosti 2.16, 2.17:

Anaeróbne bunky sú kultivované v upravenom kompletnom médiu, ktoré je zarábané v špeciálnych fľaštičkách s gumovou zátkou do ktorých sa pridáva sterol vo výslednej koncentrácii 20 µg/ml (zvyčajne ergosterol alebo cholesterol) a Tween 80 ako zdroj nenasýtených mastných kyselín vo výslednej koncentrácii 0,06%. Médium sa odvzdušňuje krátkym varom a následne intenzívnym prebublávaním dusíkom, z ktorého boli odstránené stopy kyslíka na kolóne naplnenej medenými pilinami zahriatej na 350°C. Médium je navyše obohatené o redukčné činidlá Na₂S (výsl. konc. 6 mg/l) a L-cysteín (výsl. konc. 8 mg/l), ktoré odstránia prípadné stopy kyslíka, ktorý sa mohol do média dostať pri očkovaní buniek alebo pridávaní iných prídavkov. Takto upravené anaeróbne média sú sterilizované autoklávaním.

Použité média s kultúrami kvasiniek sú autoklávané.

Polyakrylamidová gélová elektroforéza (PAGE) a Western blot analýza – miestnosť 2.16

Princípom elektroforézy je delenie proteínov v elektrickom poli podľa veľkosti náboja, molekulovej hmotnosti a tvaru. Ako nosič sa využíva polyakrylamidový gél, ktorý si pripravujeme z 40% roztoku akrylamidu a bisakrylamidu (37,5:1). Polymerizácia akrylamidu je umožnená pridaním chemikálií TEMED (N,N,N,N-tetrametyléndiamín) a persíran amónny. Proteínové vzorky nanášame v tlmivom roztoku, ktorý obsahuje dodecylsulfát sodný (SDS), 2-merkaptetoetanol a brómfenolovú modrú (farbička). Celý proces elektroforetickej separácie prebieha v aparátúre, ktorá je ponorená v tlmivom roztoku obsahujúcom Tris, glycín a SDS. Po rozdelení v géli sú proteíny prenesené na PVDF (aktivovaná metanolom) alebo nitrocelulóзовú membránu. Prenos proteínov z gélu na membránu prebieha medzi plošnými elektródami s pruhmi papierov nasiaknutými blotovacím roztokom (obsahuje metanol). Po skončení procesu je membrána inkubovaná s primárnou, a potom so sekundárnou protilátkou. Na detekciu proteínov je využívaná chemiluminiscenčná ECL metóda, metóda farbenia striebrom alebo vizualizácia cez komerčne dodávané substráty BCIP/NBT v DMSO alebo v N,N-dimetylformamide.

Príprava vzoriek na elektroforézu v akrylamidovom géli zahŕňa prácu s nebezpečnými faktormi (akrylamid, 2-merkaptetoetanol, - fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF), preto vyžaduje striktné dodržiavanie bezpečnostných opatrení a používanie osobných ochranných pomôcok. K expozícii dochádza po dobu maximálne 5 minút počas prípravy vzoriek a nalievania gélu. Metodika sa robí priebežne, približne 1-krát za týždeň.

Blotovanie vyžaduje prácu s tlmivým roztokom obsahujúcim 20% metanol, preto je dôležité dodržiavanie bezpečnostných opatrení a používanie osobných ochranných pomôcok. Doba expozície je max. 10 minút (100ml 20% metanolu) počas prípravy tlmivého roztoku, aktivácie membrány, zostavovania aparátúry, vyberania a oplachovania gélu a membrány. Expozícia N,N-dimetylformamidom je maximálne 5 min. počas vyvolávania farebnej reakcie na membráne.

Izolácia a purifikácia His značených rekombinatných proteínov pomocou afinitnej chromatografie - miestnosť 2.16:

Kvasinkové proteíny značené HIS-tagom získavame pomocou ich expresie v bakteriálnom produkčnom kmeni *E. coli*. Pre udržanie expresie proteínov pridávame baktériám do média počas ich kultivácie chloramfenikol (finálna koncentrácia 34 µg/ml) a kanamycín (finálna koncentrácia 50 µg/ml). Na izoláciu jedného proteínu v jednom experimente použijeme bakteriálnu kultúru s objemom 250 ml. Experiment robíme približne 5-10 krát za rok. Počas izolácie proteínov pridávame k bunkovému lyzátu (25 ml) PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) na výslednú koncentráciu 1 mM. Afinitná chromatografia proteínov prebieha na Ni-NTA matrici. Táto matrica si vyžaduje maximálne 10-krát ročne opätovné naviazanie niklových katiónov. Na jednu obnovu používame 100 mM roztok síranu nikelnatého v maximálnom objeme 10 ml. V priebehu afinitnej chromatografie sú proteíny omývané a eluované tlmivými roztokmi, ktoré obsahujú imidazol v maximálnej koncentrácii 500 mM. Imidazol je z proteínových vzoriek následne odstránený pomocou gélovej filtrácie. Všetky

média a kultúry obsahujúce nebezpečné látky sú likvidované autoklávovaním, roztoky sú zlievané do označených nádob.

Extrakcia lipidov, separácia tenkovrstvovou a kvapalinovou chromatografiou a vizualizácia – miestnosti 2.15, 2.13:

Z bunkových homogenátov aj z izolovaných organelových frakcií je možné pomocou organických rozpúšťadiel pomerne jednoducho extrahovať membránové a zásobné lipidy. Často využívanou extrakčnou zmesou je zmes chloroformu a metanolu, ktoré redukovujú hydrofóbne interakcie medzi lipidmi aj ich elektrostatické interakcie s membránovými proteínmi. Pre lepšiu izoláciu aniónových fosfolipidov sa k extrakčnej zmesi pridáva kyselina chlorovodíková (HCl). Extrakcia lipidov organickou zmesou trvá hodinu počas trepania. Pridanie vodného roztoku obsahujúcom 0.1 mM $MgCl_2$ do extrakčnej zmesi následne spôsobí vznik dvoch fáz a oddelenie lipidov od ostatných bunkových molekúl. Lipidy zostávajú rozpustené v spodnej chloroformovej fáze, kým polárnejšie zlúčeniny (napr. cukry, proteíny) sú asociované s vrchnou vodnou fázou. V prípade extrakcie sterolov, sú celkové lipidy hydrolyzované metanolickým hydroxidom draselným (60 % KOH v 50% metanole) pri teplote 70°C 2 hodiny. Na extrakciu sterolov sa využíva nepolárne rozpúšťadlo n-hexán. Po pridaní rozpúšťadla dôjde k oddeleniu fáz pričom steroly sú rozpustené vo vrchnej organickej fáze. Po odparení organickej fázy prúdom dusíka sú jednotlivé lipidy rozdelené tenkovrstvou chromatografiou (TLC). Na odseparovanie fosfolipidov sú využívané zmesi organických rozpúšťadiel obsahujúcich zmes chloroformu a metanolu s prídavkom kyseliny octovej alebo hydroxidu amónneho. Ďalšou (menej často) používanou metódou je opracovanie silikágelovej platne 1,8% roztokom kyseliny boritej v etanole a následná separácia fosfolipidov zmesou chloroform/etanol/voda/trietylamin. Na odseparovanie neutrálnych lipidov sa využíva zmes petroléru a dietyléru s alebo bez prídavku kyseliny octovej. Oddelené lipidy je možné na platničke vizualizovať, napr. parami jódu. Táto procedúra sa vykonáva v uzavretom exikátore, ktorý sa otvára len na čas potrebný pre vloženie a vybratie platne. Po vizualizácii jódom je možné fosfolipidy z platničky vyškrať a podrobiť ich kvantitatívnej analýze. Pre nevratnú vizualizáciu lipidov sa využíva spaľovacia zmes obsahujúca kyselinu sírovú a metanol. Okrem TLC analýzy sú sterolové molekuly analyzované aj pomocou kvapalinovej chromatografie. Mobilnou fázou je metanol (95 - 100 %) a ako pevná je využívaná reverzná fáza C8 alebo C18. V závislosti od použitej kolóny sa dĺžka analýzy jednej vzorky pohybuje od pol do celej hodiny. Rozdelené steroly sú detekované pomocou UV detektora alebo špeciálneho tzv. charged aerosol detektora (Corona CAD). Extrakcia, separácia a vizualizácia lipidov zahŕňa prácu s nebezpečnými chemickými faktormi (metanol, chloroform, petroléter), preto vyžaduje striktné dodržiavanie bezpečnostných opatrení a používanie osobných ochranných pomôcok a digestoru. K expozícii dochádza počas zmiešavania extrakčných zmesí a zmesí na delenie lipidov (5 min), počas pridávania zmesi k vzorkám (1-15 min, podľa množstva vzoriek), nanášania vzoriek na silikágelové platne (30 min) a počas vizualizácie lipidov (3 min). Metodika sa robí priebežne, približne 1 až 2-krát za týždeň.

Kvantifikácia lipidov – miestnosť 2.15:

Kvantifikáciu lipidového zloženia môžeme robiť viacerými postupmi. Jednou z možností je inkorporácia rádioaktívnej značky do štruktúry lipidu. Pomocou izotopu ^{32}P môžeme rádioaktívne značiť fosfolipidy. Pomocou izotopov ^{14}C a vodíka ^3H môžeme značiť ľubovoľné lipidy. Na kvantifikovanie fosfolipidov inkubujeme kvasinkové kmene v 5 ml média s prídavkom 2,5 μCi [^{32}P] kyseliny fosforečnej/ml. Bunky sú pestované 5-6 generácií do strednej až neskorej exponenciálnej fázy rastu za trepania pri 30 °C. Na izoláciu rádioaktívne značených lipidov s ^{14}C alebo ^3H kultivujeme kmene do požadovanej fázy rastu. Napríklad pri značení [^{14}C]-palmitátom pridáme do 10 ml kultúry 0.1 mCi [^{14}C]-palmitátu (špecifická aktivita 60 mCi/mmol) a inkubujeme 60 min pri 30 °C za trepania. Rôzne značené bunky sú následne inkubované v štiepnej zmesi, ktorá obsahuje tlmivý roztok, tioglykolát sodný, glycerol a zymolyázu. Po narušení bunkovej steny sú lipidy extrahované, separované pomocou TLC, vizualizované fosfoimagerom a kvantifikované Quantity One softvérom (BioRad) prípadne izolované zo silikagélovej platne. Množstvo rádioaktivity asociovanej s izolovanými lipidmi je stanovené scintilačným počítačom Beckman LS 600SE. Ako scintilačná kvapalina sa používa Brayov roztok (PPO, POPOP, MetOH, naftalén, etylénglykol, 1,4-dioxán). Pri práci s izotopmi sa vyžaduje striktné dodržiavanie bezpečnostných opatrení a používanie osobných ochranných pomôcok. Všetky použité kultúry a roztoky sú zlievané do označených nádob. Metodika sa nerobí bežne (1-2 krát ročne).

K nerádioaktívnej kvantifikácii fosfolipidov používame kvantifikáciu fosfátu, ktorý je súčasťou molekuly fosfolipidu. Separované fosfolipidy sú vyškriabané zo silikagélovej platne, vysušené v piecke a inkubované v pieskovom kúpeli pri 180 °C so 200 μl zmesi kyseliny sírovej a kyseliny chloristej (9:1) počas 30 min. Po ochladení sa k vzorkám pridá zmes obsahujúca ANSA (zmes $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 1-amino-2hydroxy-naftalín-4-sulfónovej kyseliny a Na_2SO_3) a $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{20}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a opäť sa inkubuje 30 min v piecke pri 105 °C. Vo výslednom roztoku sa stanoví absorbanca pri vlnovej dĺžke 830 nm pomocou spektrofotometra Shimadzu UV-2401PC. Sklenené laboratórne nádoby používané pri stanovení anorganického fosfátu sú umývané v kyseline chromsírovej a dôkladne opláchnuté vodou.

Kvantifikácia lipidov zahŕňa prácu s nebezpečnými chemickými faktormi (kyselina chromsírová), preto vyžaduje striktné dodržiavanie bezpečnostných opatrení a používanie osobných ochranných pomôcok a digestora. Metodika stanovenia fosfátu sa robí priebežne, približne 1 až 2-krát za týždeň.

Príprava lipidových vezikúl – miestnosť 2.15:

Do sklenenej skúmavky sa napipetujú lipidy rozpustené v zmesi chloroform-metanol 2:1 a rozpúšťadlo sa odparí pod prúdom dusíka. K lipidom sa pridá pufor (10mM Tris-Cl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,02% NaN_3) a po 30 min inkubácii pri laboratórnej teplote sa suspenzia sonikuje

3 x 10 min. Pri tejto metodike dochádza k expozícii NaN_3 pri príprave zásobného roztoku a pufru a manipulácii so vorkami. Metodika sa robí podľa potreby, maximálne 5 krát do roka.

Príprava protoplastov, subcelulárna frakcionácia buniek – miestnosti 2.14, 2.17:

Bunkovú stenu kvasiniek je možné odstrániť jej enzymatickým natrávením zymolýzou, ktoré nasleduje po krátkej inkubácii buniek s DTT alebo β -merkaptoetanolom. Takto opracované bunky sú následne podrobené homogenizácii, kedy dochádza k uvoľneniu ich vnútorného obsahu do roztoku. Aby nedochádzalo k degradácii proteínov, tak sa k opracovaným bunkám pridá inhibítor proteáz fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF) alebo zmes proteázových inhibítorov. Z homogenátu je potom metódou diferenciálnej centrifugácie možné postupne izolovať mitochondrie, mikrozómy, vakuoly či lipidové partikuly. Počas izolácie mitochondriálnej frakcie, mikrozómov a cytozolu používame tlmivé roztoky obsahujúce manitol alebo sacharózu, kým počas izolácie lipidových partikul či vakuol sa využívajú tlmivé roztoky obsahujúce Ficoll 400, v ojedinelých prípadoch je potrebné permeabilizovať bunky alebo subcelulárne organely digitonínom o výslednej koncentrácii 0,1% .

Príprava protoplastov a frakcií zahŕňa prácu s nebezpečnými faktormi (DTT, β -merkaptoetanol, PMSF), preto vyžaduje striktné dodržiavanie bezpečnostných opatrení a používanie osobných ochranných pomôcok. K expozícii dochádza počas navažovania chemikálií a po dobu premývania vzoriek (DTT, β -merkaptoetanol, 10 min) a homogenizácie protoplastov (PMSF, 30 min). Metodika sa robí priebežne, približne 1 až 2-krát za týždeň.

Test citlivosti kvasiniek na prítomnosť inhibítorov – miestnosti 2.16, 2.18, 2.19:

Kvasinková kultúra sa predrastie cez noc na živnom médiu. Stanoví sa koncentrácia buniek. Kultúra sa nariedi tak, aby v 5 μl bolo 10; 100; 1000 a 10 000 buniek. Týchto 5 μl sa dá automatickou pipetou na agarové misky obsahujúce príslušný inhibítor. V prípade ketokonazolu (inhibítor biosyntetickej dráhy sterolov) a myriocínu (inhibítor biosyntézy sfingolipidov) sa používajú výsledné koncentrácie 0-16 $\mu\text{g/ml}$ a 0-50 $\mu\text{g/ml}$. Agarové misky sa pripravujú pridaním inhibítorov zo zásobných roztokov o koncentrácii 1 mg/ml resp. 2 mg/ml. K expozícii nebezpečným chemickým látkam dochádza pri príprave zásobných roztokov a príprave médií. Použité média s kultúrami sa likvidujú autoklávaním.

Detekcia nukleových kyselín pomocou etídium bromidu (EtBr)- miestnosť 2.17:

Na detekciu nukleových kyselín sa štandardne v laboratóriu používajú netoxické a nemutagénne fluorescenčné indikátory (napr. GelRed alebo SYBR Safe DNA gel stain). V niektorých špeciálnych prípadoch je potrebné použiť etídium bromid. V tomto prípade sa pripraví 100 ml farbiaceho roztoku EtBr vo vode o výslednej koncentrácii 1 $\mu\text{g/ml}$ EtBr zo zásobného roztoku o koncentrácii 10 mg/ml pridaním 10 μl . Agarózový gel sa farbí v tomto roztoku 20-40 min a vizualizuje pomocou UV žiarenia s vlnovou dĺžkou 302 nm. Pri využití UV zdrojov treba používať UV zachycujúci ochranný štít na tvár a ochranné rukavice. Roztok EtBr

sa dekontaminuje pomocou aktívneho uhlia. Aktívne uhlie s EtBr sa likviduje ako nebezpečný odpad. Metodika sa robí maximálne 10 krát ročne.

Inhibícia eukaryotickej translácie- miestnosť 2.17:

Cykloheximid je silným inhibítorom translácie na eukaryotických ribozómoch. Na zablokovanie translácie sa používa v koncentrácii 0.5-2 $\mu\text{g/ml}$ podľa použitého kvasinkového kmeňa. Pridáva sa do minimálneho množstva média (typicky 20 ml) zo zásobného roztoku o koncentrácii 2 mg/ml. K expozícii nebezpečným chemickým látkam dochádza pri príprave zásobných roztokov a príprave médií. Použité média s kultúrami sa likvidujú autoklávaním. Metóda sa v laboratóriu využíva ojedinele.

Imunofluorescenčná analýza- miestnosť 2.17:

Na imunofluorescenčnú analýzu sa používajú suspenzie buniek, ktoré sa fixujú v 2% paraformaldehyde alebo v 3,7% formaldehyde 45 minút pri laboratórnej teplote. Nasleduje premytie v PEMS a inkubácia v roztoku zymolyázy v PEMS 90 minút pri 37°C. Bunky s natrávenou bunkovou stenou sa opracujú 2% Tritonom-X100 2 minúty a premyjú roztokom PEMu pri laboratórnej teplote. Následne sa preparát inkubuje v primárnej protilátke a po premytí v PBS v sekundárnej protilátke. Metodika sa robí podľa potreby v priemere 2 krát do mesiaca.

Izolácia nukleových kyselín- miestnosť 2.17:

Na izoláciu nukleových kyselín (RNA) sa používajú zmesi fenol-chloroform a chloroform-izoamylalkohol. Bunkové pelety sa s fenol-chloroformom inkubujú 60 min pri 65 °C v digestore a následne sú fenol-chloroform a chloroform-izoamylalkohol použité na oddelenie vodnej a organickej fázy centrifugáciou pri 4°C. RNA z vodnej fázy je následne prezrážaná 100 % etanolom. Potrebné množstvá chemikálií sú 1,5 ml fenol-chloroformu a 700 μl chloroform-izoamylalkoholu na 1 vzorku, čo umožňuje zisk približne 200 μg RNA.

Metodika zahŕňa prácu s nebezpečnými chemickými faktormi, preto vyžaduje striktné dodržiavanie bezpečnostných opatrení a používanie osobných ochranných pomôcok a digestora. Metodika sa robí podľa potreby v priemere raz mesačne.

4. Pravidlá pre prácu s chemickými faktormi v laboratóriách

Prácu s toxickými a veľmi toxickými látkami a zmesami môže viesť len osoba, ktorá vlastní platné osvedčenie o odbornej spôsobilosti na túto činnosť:

- RNDr. Dana Tahotná, CSc. – číslo osvedčenia: OOD/ 8223 /2016

S chemickými faktormi môže pracovať len osoba, ktorá bola riadne a preukázateľne oboznámená na prácu s týmito látkami.

Pred vstupom do laboratórií je nutné obliecť si pracovný plášť a obuť pracovnú obuv.

Pri práci treba používať ochranné pracovné prostriedky (ochranné rukavice, pracovný odev a respirátor, prípadne ochranné okuliare alebo štít na celú tvár).

Pracovný priestor na prácu s nebezpečnými chemickými faktormi musí byť zreteľne vyznačený.

Pri práci s prchavými toxickými látkami sa používajú certifikované chemické digestory (miestnosti 2.15 a 2.16).

Pracovné miesto musí byť udržiavané v poriadku a čistote.

Ak sa pracovná plocha kontaminovala, treba ju okamžite dekontaminovať.

Pracovné oblečenie a osobné veci musia byť uložené oddelene.

Je zakázané pipetovať ústami.

V laboratóriách sa nesmie jesť, piť, fajčiť.

Počas pracovnej doby je zakázané požívať alkoholické nápoje, omamné a psychotropné látky a pod ich vplyvom nastupovať do zamestnania.

Do miestnosti, kde sa pracuje s chemickými látkami môže vstupovať iná osoba len v sprievode zodpovednej osoby z laboratória.

5. Uchovávanie chemických faktorov

Všetky chemické látky a zmesi ktoré sa nachádzajú v sklade chemikálií a v laboratóriách, sú skladované v zmysle platnej legislatívy. Znamená to, že toxické a veľmi toxické látky a zmesi sú uskladnené samostatne, (aby nedochádzalo vzájomnému pôsobeniu látok) v uzamykateľnej skrinke. Spotreba a prísun toxických a veľmi toxických látok a zmesí sa kontroluje a písomne eviduje do zošitov evidencie prísunu a odberu týchto látok. Zodpovednosť za prísun a odber NCHL má osoba s odbornou spôsobilosťou na prácu s toxickými a veľmi toxickými látkami a zmesami.

Horľaviny sú uložené v uzamknutej plechovej skrini, žieraviny sú v inej uzamknutej plechovej skrini a metanol ako horľavá a zároveň toxická látka je uskladnený v samostatnej uzamknutej plechovej skrini. Kyseliny sú skladované v osobitnej skrini.

Chemické látky využívané na denné použitie sú uložené v skrinkách v laboratóriách alebo v hlboko mraziacom boxe a chladničkách.

Ostatné chemické látky sú uložené v skrinkách v laboratóriách. Na uchovávanie nebezpečných chemických faktorov v zmysle vyššie uvedených pravidiel slúžia miestnosti č. 2.13, 2.15, 2.16, 2.17, 2.18.

6. Označovanie chemických faktorov

Takmer všetky chemické látky a zmesi v laboratóriách sa nachádzajú v originálnych obaloch od výrobcov a teda spĺňajú požiadavky kladené na označovanie chemických látok a zmesí. Tie chemické látky, ktoré nie sú v originálnych obaloch alebo sú to pripravené roztoky, príp. sú to staré chemikálie, ktorých značenie nevyhovuje súčasným legislatívnym požiadavkám, sú označené štítkom, na ktorom sú všetky údaje potrebné na spoľahlivú identifikáciu (názov látky alebo roztoku, koncentrácia, dodávateľ, mol. hmotnosť, výstražný symbol, dátum prípravy), aby sa zamedzilo ich zámene.

7. Likvidácia chemických faktorov

V uvedených laboratóriách sa vo väčšine prípadov manipuluje s nebezpečnými chemickými látkami v kvapalnej podobe s veľmi nízkou koncentráciou nebezpečnej chemickej látky (mg/ml, µg/ml) a používané množstvá na manipuláciu sa pohybujú objemoch max. desiatok a stoviek ml. Nespotrebované objemy nebezpečných chemických látok sa obvykle zmrazujú a používajú sa pri ďalších pokusoch. Je to z dôvodu minimalizácie množstva nebezpečných odpadov. Prebytočné roztoky kyselín a hydroxidov sa po vysokom zriedení vylievajú do kanalizácie. V prípade výskytu prebytočných roztokov s obsahom toxických a veľmi toxických látok sa tieto zhromažďujú v sklenených označených fľašiach. Organický odpad sa zhromažďuje oddelene. Pracovné pomôcky, ktoré prišli do styku s nebezpečnými chemickými látkami (pipetové špičky, rukavice, plastové nádoby) sa zhromažďujú v označených plastových vreciach. Toxické a veľmi toxické odpady ako aj pracovné pomôcky, ktoré prišli do styku s nebezpečnými chemickými látkami sú zneškodňované v zmysle zmlúv s firmou DETOX s. r. o. Zvolenská cesta 139, 974 05 Banská Bystrica; číslo zmluvy: ZDS-2017-22-000036.

8. Udalosť, nehoda a porušenie pravidiel

Udalosť

Každá udalosť, ktorá by mohla spôsobiť alebo už spôsobila nekontrolovaný únik nebezpečnej chemickej látky, musí byť individuálne posúdená z hľadiska jej dôsledku a v prípade závažného zistenia aj zaevidovaná.

Príklad:

- rozliatie roztoku nebezpečnej chemickej látky alebo rozsypanie práškovej nebezpečnej chemickej látky do pracovného priestoru, na podlahu, na odev, resp. nechránené časti tela.

Postup v prípade udalosti:

- prerušiť prácu, kontaktovať vedúceho projektu a zreteľne opísať danú udalosť
- pokúsiť sa zabrániť ďalšiemu šíreniu nebezpečnej chemickej látky do okolia a pokračovať v zmysle havarijného plánu
- zaznamenať všetky zlyhania počas práce a analyzovať udalosť

Nehoda

Nehoda zahŕňa všetky udalosti, pri ktorých počas manipulácie s nebezpečnými chemickými látkami došlo k zraneniu zamestnancov. Každá nehoda musí byť zaznamenaná.

Postup pri nehode:

- okamžite nehodu ohlásiť priamemu nadriadenému alebo vedúcemu projektu
- v prípade poranenia (porezanie, pichnutie) nechať ranu krváčať tak dlho, ako je to možné, potom opláchnuť po tečúcou vodou a následne opláchnuť 70 % alkoholom alebo jódom tinktúrou
- v prípade, že došlo k požitiu toxickkej, príp. veľmi toxickkej chemickej látky, treba postupovať podľa nasledovných pravidiel:
 - prerušiť pôsobenie jedu a zabrániť jeho ďalšiemu vstrebávaniu
 - jed eliminovať z organizmu
 - jed neutralizovať podaním protijedu
 - udržiavať životne dôležité funkcie (dýchanie, krvný obeh) a zabezpečiť lekársku pomoc alebo odvoz do nemocnice

Zabránenie ďalšiemu vstrebávaniu jedu

- podľa mechanizmu jeho účinku a brány vstupu do organizmu.

Inhalačné otravy

Pri otravách plynmi a výparmi treba postihnutého čo najskôr vyniesť zo zamoreného prostredia a uvoľniť mu šatstvo. Väčšina inhalovaných plynov a pár sa z organizmu odstráni vydýchaním (exhaláciou). Preto je dôležité dbať na dobrú funkciu dýchania postihnutého.

Otravy vstrebaním cez kožu

Najdôležitejším úkonom je vyzliecť odev poliaty jedom, resp. žieravinou, dôkladné omytie poliatej časti tela prúdom tečúcej vody, pri poliatí fenolom a benzénom umytie mydlom a následne vodou. Mydlo nepoužijeme vtedy, ak sú na koži pokročilé patologické zmeny.

V týchto prípadoch postupujeme ako pri popáleninách a taktiež sa usilujeme predísť šoku postihnutého.

Perorálne otravy

Pri perorálnych otravách treba čo najskôr z tráviaceho traktu odstrániť zvyšky nevstrebateľného jedu vyvolaním zvracania, výplachom žalúdka a prehľadkami. Ak postihnutý spontánne zvracia a má hnačku, neusilujeme sa ich tmiť, ale ak to zdravotný stav postihnutého umožňuje, podporujeme ich. Súčasne však treba predchádzať odvodneniu organizmu prísunom dostatočného množstva tekutín.

Zvracanie. Vyvolá sa, prípadne podporí, pitím vlažnej slanej vody pripravenej rozpustením čajovej lyžičky kuchynskej soli v pohári vody. Zvracanie sa nevyvoláva, ak postihnutý je v bezvedomí, v kŕčoch a po požití žieravín, aby nedošlo k prederaveniu naleptaného pažeráka.

Výplach žalúdka. Žalúdok sa vyplachuje vlažnou vodou alebo fyziologickým roztokom, ktorý si pripravíme rozpustením čajovej lyžičky soli v litri vody. Pri otravách organickými rozpúšťadlami a látkami rozpustnými v tukoch sa robia výplachy 150-300 ml parafínového oleja.

Neutralizácia jedu podaním protijedu

Ak sa nepodarilo zabrániť vstrebaniu jedu do organizmu, usilujeme sa neutralizovať jed podaním protijedu. Univerzálnym protijedom v bežných laboratórnych podmienkach je živočíšne uhlie.

Udržiavanie životne dôležitých funkcií

Pri ťažkých otravách, kedy môže dôjsť k bezvedomiu a zastaveniu dýchania, príp. krvného obehu je nevyhnutné okamžite začať s oživovaním podľa postupu:

1. vyčistiť ústnu dutinu
2. uložiť postihnutého naznak na tvrdú a rovnú podložku
3. zakloniť hlavu
4. upchať nos
5. vykonať 2 umelé vdychy z pľúc do pľúc
6. vykonať 15 stlačení hrudníka o cca 5 cm
7. pokračovať v oživovaní v pomere 2 vdychy : 15 stlačení hrudníka; hrudník stláčať asi jedenkrát za sekundu až do obnovenia spontánnej srdcovej a dychovej aktivity alebo do príchodu lekárskej prvej pomoci

Opatrenia pri šoku

Pri šoku pôsobí postihnutý nepokojným dojmom, je mu nevoľno, je bledý, má studenú a spotenú kožu, slabý pulz a zrýchlené dýchanie.

Postupuje sa nasledovne:

1. postihnutého pohodlne uložiť, zaistiť pokoj, aktívne upokojovať
2. zabrániť podchladeniu prikrytím dekou alebo plášťom
3. zdvihnúť dolné končatiny o cca 30 cm (autotransfúzna, protišoková poloha)
4. privolať lekársku pomoc
5. kontrolovať vedomie, dýchanie a pulz

Prevoz do nemocnice sa zabezpečuje aj pri otravách s ľahším priebehom, kedy sa zdá, že ich postihnutý prekonal

- v prípade nehody s kyselinou – ak kyselina pôsobí na pokožku, odstráni sa odev a postihnuté miesto sa omyje prúdom tečúcej vody. Pri poleptaní očí, kedy je bolesť sprevádzaná kŕčom očného svalstva, je nevyhnutné prstom odtiahnuť viečko a oplachovať oko prúdom vody smerom od nosa, aby voda nevtekala do druhého oka. Pri požití koncentrovaných kyselín sa nevyvoláva vracanie kvôli nebezpečenstvu perforácie pažeráka a žalúdka, ale obsah žalúdka sa zriedi vypitím čistej vody. Na neutralizáciu sa podáva 3% roztok hydrogénuhličitanu sodného (sóda bikarbóna, lekárska sóda). V prípade, že boli zasiahnuté oči a ústa, opláchnuť ich veľkým množstvom vody.
2. prvá pomoc pri nehode s hydroxidmi je v podstate rovnaká ako u kyselín s tým rozdielom, že na neutralizáciu sa podáva zriedený roztok octu alebo 3% kyselina citrónová. Pri poleptaní povrchu tela väčšieho rozsahu sa rany po opatrnom omytí vodou prekryjú sterilným obvazom a postihnutý sa odvezie k lekárovi.
 3. vyhľadať lekársku pomoc
 4. nehodu písomne zaznamenať

Porušenie pracovných pravidiel

Akákoľvek iná manipulácia s nebezpečnými chemickými faktormi, ktorá nie je popísaná v tomto Prevádzkovom poriadku sa môže považovať za porušenie pracovných pravidiel a musí byť zaznamenaná.

9. Postup v prípade kontaminácie priestoru rizikovým faktorom

- Všetky činnosti vykonávať v rukaviciach!
- Ak je to možné, odstrániť všetky prekážky z kontaminovanej oblasti.
- Rozliaty roztok chemickej látky podľa jej povahy treba neutralizovať alebo odsáť savým materiálom, ktorý potom treba uložiť do odpadovej nádoby na to určenej.
- Miesto dôkladne umyť vodou.
- Prístroje a iné laboratórne pomôcky kontaminované rozliatym roztokom umyť dostatočným množstvom vody, prípadne sterilizovať v autokláve (sklenený a kovový materiál).
- Pri rozsypaní chemickej látky ju treba opatrne zozbierať tak, aby sa nezvírila do vzduchu. Uložiť do nádoby na to určenej. Podľa povahy chemickej látky treba použiť rúško na tvár, ochranné okuliare a ochranné rukavice. Miesto dôkladne umyť vodou a zabezpečiť dostatočné vyvetranie miestnosti.
- Po skončení prác si treba umyť ruky vodou a mydlom.

10. Ochranné a preventívne opatrenia

lekárske prehliadky:

- pri nástupe do zamestnania (vstupná lekárska prehliadka)
- pravidelná 1x2 roky, zameraná na psychickú a fyzickú spôsobilosť na prácu s NCHF (výsledky sú uložené na sekretariáte riaditeľa ústavu)
- ak o LPP zamestnanec požiada

technické opatrenia:

- v laboratóriách sú umiestnené funkčné chemické digestory
- prehodnocovať použitie NCHF v jednotlivých pracovných postupoch a nahrádzať ich neškodlivými pre zdravie zamestnanca
- rizikové pracoviská sú vyznačované páskou
- v prípade potreby merať koncentrácie NCHL v pracovnom priestore zamestnanca
- v prípade potreby merať odťah chemického digestora

organizačné opatrenia:

- do laboratórií majú prístup len povolaní zamestnanci

- návštevníci len v sprievode povolanej osoby
- prevádzkové predpisy sú umiestnené na dobre viditeľnom mieste
- k dispozícii je lekárnička prvej pomoci
- zamestnávateľ na vlastné náklady prideluje OOPP na základe posúdenia rizika

povinnosti zamestnancov:

- pracovať s NCHF len po dobu nevyhnutnú na vykonanie práce
- dodržiavať pokyny a príkazy svojho nadriadeného
- na pracovisku dodržiavať poriadok, čistotu a všeobecné hygienické zásady
- po prerušení práce s NCHF alebo po skončení práce s nimi si umyť ruky
- po skončení práce vypnúť všetky elektrospotrebiče
- zisťovať možné riziká na pracovisku a po ich zistení informovať svojho nadriadeného
- zúčastňovať sa na školeniach BOZP
- v prípade nehody urobiť všetky opatrenia na jej odstránenie
- oboznámiť sa a dodržiavať prevádzkový poriadok
- používať vhodné osobné ochranné prostriedky

v laboratóriách je zakázané:

- jesť, piť, fajčiť
- používať akékoľvek zápalné zdroje
- používať elektrické zariadenia bez oprávnenia a povolenia
- vykonávať práce, na ktoré nemajú zamestnanci odbornú spôsobilosť

vhodné osobné ochranné pracovné prostriedky:

Profesia	laborant, diplomant, doktorand, odborný pracovník, vedecký pracovník
Ochrana dýchacieho ústrojenstva kolektívna	digestor, prirodzené vetranie
Ochrana dýchacieho ústrojenstva osobná	rúško, dýchacia maska
Ochrana rúk	rukavice EN 374 – 1, 2, 3
Ochrana očí, tváre	štít, ochranné okuliare EN 166
Ochrana celého tela	pracovný odev (nohavice, tričko, košeľa, plášť) a obuv

ďalšie opatrenia:

- periodické školenia zamestnancov **1x ročne** (odborne spôsobilou osobou CHF, BF)
- všeobecná bezpečnosť, legislatíva **1x za 2 roky** (technik BOZP)
- prehodnotenie rizika pri každej významnej zmene