

NÁVOD PRO STANOVENÍ ŽIVOTASCHOPNÝCH MIKROORGANISMŮ V BIOAEROSOLECH

MONITORING VNITŘNÍHO PROSTŘEDÍ V MATEŘSKÝCH ŠKOLKÁCH 2016

1 Úvod

1.1 Předmět a vymezení působnosti

Tento postup je určen pouze pro projekt SZU – Monitoring vnitřního prostředí v mateřských školách v roce 2016.

Cílem tohoto návodu je konkretizovat a sjednotit pracovní postup při odebrání vzorků ovzduší pro stanovení počtu životaschopných organismů v ovzduší mateřských školek. Platí pro stanovení celkového počtu životaschopných mikroorganismů vyrostlých na selektivní půdě při 30°C ± 1°C a pro stanovení celkových počtů plísní a kvasinek v ovzduší vyrostlých na selektivní půdě při 25 ± 1°C.

1.2 Definice a terminologie

- **Celkový počet mikroorganismů /CPM/** - životaschopné mikroorganismy vyrostlé na selektivní kultivační půdě vyrostlé za podmínek zkoušení specifikovaných tímto předpisem.
- **Celkový počet plísní a kvasinek /CP/** Pro účely tohoto SOP platí že, kvasinky a plísně jsou mikroorganismy, které při aplikaci metody popsané tímto SOP tvoří kolonie na selektivní kultivační půdě při 25 °C
- **Vnější ovzduší** - ovzduší vně budov v troposféře
- **Vnitřní ovzduší** - ovzduší, které nemá přímé spojení s ovzduším venkovním, v tomto případě ovzduší v obytné místnosti dětí.
- **Měřicí místo** – místo, kde je prováděn odběr vzorku ovzduší aeroskopem.
- **KTJ (CPM)** – kolonie tvořící jednotku

1.3 Podstata zkoušky

Mikroorganismy z určitého objemu ovzduší (100 l) se zachytí na Petriho misky s vhodnou kultivační půdou nasáváním aeroskopem. Aeroskop nasává vzduch, který prochází nejprve perforovaným víkem, kolmo na Petriho misku (Ø 90mm) s agarem. Dopadová rychlost mikroorganismů ze vzduchu na povrch agaru je přibližně 11 m/sec (musí být <20m/s). Tato rychlost zajišťuje, že všechny částice o velikosti větší než 1 mikron budou zachyceny. Po skončení odběru se misky okamžitě označí permanentním popiskem. Pokud se nezpracují ihned, musí se uchovávat při maximální teplotě 1- 6°C .

Inokulované misky s kontaminací z ovzduší se kultivují při 30°C ± 1°C /CPM/ a 25± 1°C /CP/.

datum vydání: 24.01.2016
Státní zdravotní ústav Centrum hygieny životního prostředí, OHHO

Po skončení kultivace se provede odečet narostlých kolonií a stanoví se počet mikroorganismů (v KTJ) v 1 m³ vzduchu. Při práci je nutné dodržovat níže uvedené normy včetně pokynů pro odběr a dopravu vzorků ke zpracování. Odběr zajišťují pracovníci spolupracující laboratoře.

1.4 Rozsah použití

Pracovní postup je určen k odběru vzorků ovzduší obytných místností mateřských školek a venkovního ovzduší aeroskopem pro následné stanovení celkového počtu životaschopných mikroorganismů vyrostlých na selektivní půdě při 30°C ± 1°C a stanovení celkových počtů plísní a kvasinek v ovzduší vyrostlých na selektivní půdě při 25 ± 1°C.

1.5 Související normy a předpisy

- **ČSN EN ISO 7218 (560103) a ČSN EN ISO 7218:2008/A1 (560103)** - Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení.
- **ČSN ISO 21527-1 (560650)** - Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní - Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95.
- **ČSN EN ISO 4833-2** - Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 2: Technika roztěrem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C
- **Vyhláška č. 6/2003 Sb.**, kterou se stanoví hygienické limity chemických, fyzikálních a biologických ukazatelů pro vnitřní prostředí obytných místností některých staveb.
- **Metodický návod MZ ČR: OVZ-32.0-0.8.3.07/8559** pro měření a stanovení chemických, fyzikálních a biologických ukazatelů kvality vnitřního prostředí podle vyhlášky č. 6/2003 -
- **ČSN EN ISO 16000-1** Vnitřní ovzduší – Část 1: Obecná hlediska odběru vzorků
- **AHEM číslo 1/2002** Standardní operační postupy pro vyšetřování mikroorganismů v ovzduší a pro hodnocení mikrobiologického znečištění ovzduší ve vnitřním prostředí
- **Technická dokumentace** - Pokyny výrobce pro provozování aeroskopu

1.6 Rušivé vlivy

Rušivý vliv může mít eventuální výskyt mikroorganismů (plísní a kvasinek), které mohou způsobit přerůstání ploten a znemožnit nebo zbrzdit růst ostatních mikroorganismů, případně znemožnit jejich odečet.

1.7 Bezpečnost

Obecné požadavky na bezpečnost práce v mikrobiologické laboratoři. Pracovníci musí postupovat podle provozního řádu laboratoře a interních předpisů, je třeba přihlížet ke specifickým předpisům a zásadám s ohledem na charakter prostředí a používaná media.

2 Pracovní postup

2.1 Všeobecně

Postup pro stanovení životaschopných organismů pomocí aeroskopu je popsán v Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica číslo 1/2002 z listopadu 2001 jako Standardní operační postupy pro vyšetřování mikroorganismů v ovzduší a pro hodnocení mikrobiologického znečištění ovzduší ve vnitřním prostředí a ve vyhlášce 6. V závislosti na tomto postupu jsou upraveny postupy odběru vzorku.

2.2 Kultivační půdy

- CPM
Kultivační agarová půda obsahuje glukózu, trypton a kvasničný autolyzát. Na její přípravu lze použít komerčně dostupné sušené půdy a její příprava se řídí pokyny výrobce. Používá se půda uvedená v ČSN EN ISO 4833-2 - Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 2: Technika roztěrem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.
- CP
Používá se půda popsaná v normě ČSN ISO 21527-1 (560650) Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní - Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95. **Lze použít komerčně dostupné půdy.**

2.3 Přístroje a pomůcky

- používají se běžně dostupné postupy, přístroje a zařízení předepsané pro mikrobiologickou laboratoř (ČSN EN ISO 7218 (560103) a ČSN EN ISO 7218:2008/A1 (560103),
- termostat udržující teplotu $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ a $25 \pm 1 ^\circ\text{C}$,
- zařízení na počítání kolonií sestávající z osvětlené desky a mechanického nebo elektronického digitálního počítače,
- přenosná termotaška udržující teplotu 4 – 6 °C,
- aeroskop.

2.4 Odběr vzduchu

Odběry vzduchu se provádí aeroskopem MAS 100 nebo A-AIR-010. **Na každou misku se odebírá 100 l vzduchu.** Práce s aeroskopem se řídí návodem v technické dokumentaci příslušného aeroskopu. Při vkládání misek do aeroskopu se pracuje rychle, za dodržení aseptických podmínek, hlava se před každým použitím dekontaminuje otřením etanolem a vysušením sterilní gázou nebo buničinou.

Po skončení odběru se misky okamžitě uzavřou, označí permanentním popiskem, a co nejrychleji se přepraví v chladicí tašce do laboratoře. Perforované víko aeroskopu se oře lihovým detergentem.

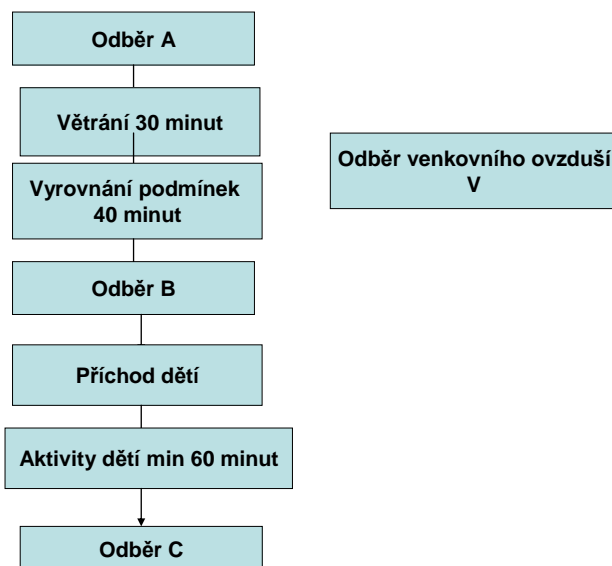
2.4.1 Výběr prostor pro měření a intervaly odběrů vzduchu.

Pro monitoring kontaminace ovzduší ve školkách se vyberou prostory, kde děti tráví nejvíce času, herny, pracovny atd. **Odběry vzduchu se provádí ve výšce 110 -120 cm od země.**

2.4.2 Harmonogram odběrů:

První odběr se provádí před příchodem dětí do školky a před vyvětráním místnosti (Odběr A). Po tomto odběru se vyvětrá místnost (nejméně 30 minut) a po 30-40 minutách se provede další odběr (odběr B). Další odběr (nejdříve po 40 minutách) se provede během aktivity dětí (odběr C). Mezi odběry během větrání a vyrovnávání podmínek nebo po skončení odběrů A-C se provede odběr venkovního ovzduší (odběr V). Odběr venkovního ovzduší se provádí, pokud je to možné, na stejné straně budovy, jako jsou okna, kterými bylo větráno. Pokud to nelze provést, místo odběru vhodně vybere pověřený pracovník a údaje uvede do protokolu.

Harmonogram odběru:



Při každém odběru (A-C a V) se odebere vzduch na 5 misek, to znamená, že bude odebráno, pro každý odběr 5 x 100 l pro CPM a 5 x 100 l pro CP. Misky se označí a transportují do laboratoře v souladu s AHEM číslo 1/2002.

2.5 Inkubace, odečítání a vyhodnocení

Petriho misky pro CPM se po doručení do laboratoře ihned vloží do termostatu a inkubují se při $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 – 72 hodin, dnem vzhůru. Petriho misky pro CP se po doručení do laboratoře ihned vloží do termostatu a inkubují se při $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ po dobu 3-5 dnů (dle AHEM číslo 1/2002).

datum vydání: 24.01.2016
Státní zdravotní ústav Centrum hygieny životního prostředí, OHHO

Počítání kolonií

Po předepsané době inkubace se spočítají všechny narostlé kolonie. Počítají se ty misky, ve kterých celkově nenarostlo více než 300 kolonií (pro CPM) a 150 kolonií (pro CP). Zjištěné kolonie na misce se v případě potřeby přepočítají podle korekční tabulky daného aeroskopu, pak se přepočítají na 1m^3 a uvedou se do protokolu pro každou misku zvlášť (jako počty KTJ v 1m^3).

3 Kontrola kvality

3.1 Vnitřní kontrola

Kontrola sterility půd se provádí během každého šarže odběrů a kontrola vhodnosti půd při každé nové nakoupené šarži komerční půdy.

Pro zajištění kontroly kvality dále slouží:

- kontrola úrovně kontaminace laboratorního prostředí – ovzduší, povrchy
- kontrola kvality živných půd (pH, selektivita, růstové vlastnosti referenčními kmeny)
- kontrola sterility živných půd
- množství odebraného vzduchu – kontrola aeroskopu 1x za 5 let (podle počtu provozních hodin)

3.2 Vnější kontrola

Není realizována v důsledku absence pořádání mezilaboratorních porovnávacích testů. V mezích možností se provádí alespoň jednou ročně mezilaboratorní porovnávací měření s jinými laboratořemi.

4 Odstranění odpadů

Naočkované misky jsou po vyhodnocení odstraněny v souladu se zákonem 185/2001 Sb., o odpadech a s provozním řádem laboratoře.

PROTOKOL - MONITORING VNITŘNÍHO PROSTŘEDÍ
V MATEŘSKÝCH ŠKOLKÁCH 2016

Laboratoř provádějící monitoring.....

Název školky.....

Adresa školky.....

Datum

Průtok nasávaného vzduchu aeroskopem typ aeroskopu.....

odběrové místo	miska č.	čas odběru**		CPM (KTJ..m ⁻³)		CP (KTJ..m ⁻³)		Poznámka
		začátek	konec	před korekcí	po korekci	před korekcí	po korekci	
A	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	μ*							
B	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	μ*							
C	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	μ*							
V	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	μ*							

μ* - průměrná hodnota

** - zaznamenaná se čas odběru na první misku a čas ukončení odběru u páté misky