

## **Akutní test s luminiscenční bakterií (*Vibrio fischeri*) zpracováno podle ISO 14735 (2005)**

Jedná se o rychlý, jednoduchý a levný test akutní toxicity na prokaryotickém organismu, který slouží ke sledování toxických účinků nejen čistých chemických látek či jejich roztoků, ale i environmentálních směsí extrahovaných z různých vzorků. Tato metoda je méně vhodná pro silně zabarvené vzorky nebo vzorky obsahující nerozpuštěné látky nebo látky, které reagují s živným roztokem nebo podléhají změnám během zkoušky (například vysrážení, biochemickému nebo fotochemickému rozkladu), a tím mohou poskytovat nesprávné výsledky, popřípadě zhoršit reprodukovatelnost

### **Princip**

Testovacím organismem v testu je bakterie *Vibrio fischeri*, která za optimálních podmínek intenzivně luminuje (světélkuje). Test je založen na zhášení bioluminiscence této bakterie je-li ve vzorku přítomna biodostupná toxická látka, která může metabolickou aktivitu bakterií významně snížit, případně zastavit. To se ihned projeví poklesem intenzity luminiscence (bioluminiscence). Množství emitovaného světla se měří luminometrem před a po přidání testované látky (po 15 a 30 minutách expozice). Teplota v průběhu testu musí být konstantní ( $t = 15^{\circ}\text{C}$ ).

### **Přístroje**

Cirkulační termostat s možností teploty na  $15^{\circ}\text{C}$ , luminometr

### **Chemikálie a spotřební materiál**

automatické pipety 5 – 50  $\mu\text{l}$ , 50 – 200  $\mu\text{l}$ , 200 – 1000  $\mu\text{l}$ , 1000 – 5000  $\mu\text{l}$ , špičky, NaCl, Síran zinečnatý ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 3,5-Dichlorfenol, Dichroman draselný ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )

### **Podmínky testu:**

- teplota:  $15^{\circ}\text{C}$
- délka expozice 30 min.

### **Příprava vzorku**

Testované látky naředíme v požadovaných koncentracích ve zkumavkách, jako standardní rozpouštědlo se používá 2% NaCl (chlorid sodný). Environmentální vzorky se zkoušejí co nejdříve po odběru či přípravě. Vzorek se důkladně protřepe a je-li to nutné, homogenizuje. Vzorek by měl být upraven na  $\text{pH } 7,4 \pm 0,3$

### **Postup testu**

- K zamražené kultuře bakterie ihned po otevření přidáme 0,5 ml 2% NaCl a necháme v ledové lázni.
- Po 15 minutách rehydratace přidáme 80  $\mu\text{l}$  do 2,5 ml vychlazeného 2% NaCl a necháme 15 minut vytemperovat.
- Zředěná suspenze bakterií se pipetuje do 12 zkumavek po 200  $\mu\text{l}$ .
- Po dalších 15 minutách ekvilibrace se měří počáteční intenzita světla synchronizovaně po 30 sekundách. Po každém měření se přidává 800  $\mu\text{l}$  2% NaCl (negativní kontrola) respektive měřeného vzorku.
- Další měření se provádí po 15 a 30 minutách.

**Výpočty**

Nejdříve vypočítáme koeficienty přirozeného vyhasínání bioluminiscence pro jednotlivé časy:

$$R(t) = I_K(t) / I_K(0)$$

kde  $R(t)$  je koeficient přirozeného vyhasínání v čase  $t$ ,  $I_K(t)$  je intenzita bioluminiscence u kontroly v čase  $t$  a  $I_K(0)$  je intenzita bioluminiscence u kontroly v čase 0.

Ke kvantitativnímu vyhodnocení se vypočte % úbytek světla (inhibici luminiscence):

$$\text{Inh \%} = [R(t) \cdot I(0) - I(t)] / [R(t) \cdot I(0)] \cdot 100$$

kde,  $R(t)$  je koeficient přirozeného vyhasínání v čase  $t$ ,  $I(0)$  je bioluminiscence v čase 0, kdyby neobsahoval toxikant a  $I(t)$  je naměřená bioluminiscence v čase  $t$ .

**Ověření citlivosti**

Zkouška se považuje za platnou pokud jsou splněny následující podmínky:

- Koeficient přirozeného vyhasínání  $R(t)$  se pohybuje v rozmezí 0,6-1,8
- Referenční roztoky (všechny tři pro zasobní kulturu nebo pouze dichroman draselný pro každý test) způsobují 20-80% inhibici po 30 minutách pro následující koncentrace standardních látek:

3,4mg/l 3,5-Dichlorphenol

2,2 mg/l Zn (II)            9,67 mg/l ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

18,7 mg/l Cr (VI)        52,9 mg/l K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>