

**Stanovení inhibičního účinku  
vzorků vod na světelnou emisi  
*Vibrio fischeri***

Zkouška na luminiscenčních  
bakteriích

**ČSN EN ISO 11348-3**

**ISO 11348-3:1998**

# ISO 11348

- ISO 11348-1 postup pro čerstvě připravené bakterie
- ISO 11348-2 postup pro sušené bakterie
- **ISO 11348-3 postup pro lyofilizované bakterie**

# Metoda je použitelná pro:

- ✓ Odpadní vody
- ✓ Vodné výluhy
- ✓ Sladké, slané a brakické vody
- ✓ Pórové vody

# Podstata zkoušky

- Stanovení inhibice emise světla kultury *Vibrio fischeri* v koncentrační řadě
- Zkušebním kritériem je snížení luminiscence po expozici 15 a 30 min nebo volitelně po 5 min
- Inhibice vzorkem je vyjádřena jako ředění vyvolávající 20% a 50% inhibici emise světla v porovnání s kontrolou

# Rušivé vlivy

- Nerozpustné, málo rozpustné, těkavé látky, látky reagující s ředící vodou, zkušební suspenzí, měnící své složení v průběhu zkoušky
- Silně zbarvené nebo zakalené vzorky
- Vzorky s vysokou spotřebou kyslíku
- Znečištění vzorku organickými dobře biologicky rozložitelnými živinami
- Koncentrace solí přesahující 30 g/l

# Chemikálie a materiály

- Bakterie *Vibrio fischeri* NRRL B-11177
  - Uchovávané v mrazničce při -18 až -20°C
- Roztok NaCl
  - ředící voda
- Roztok NaOH
- HCl
  - Pro úpravu pH
- Médium pro lyofilizované bakterie (NaCl, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, KCl)
- Srovnávací látky (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)

# Přístroje a pomůcky

- Mraznička
- Chladnička
- Termoblok s řízenou teplotou
- Luminometr
- pH-metr
- Chlazená odstředivka
- Konduktometr
- Stopky
- Automatické pipety
- Zkušební zkumavky

# Odběr a úprava vzorků

- Odběr vzorku
  - Odběr do chemicky inertních a čistých nádob, po okraj nádoby, těsné uzavření
  - Testování co nejdříve po odběru, případné uchovávání 48hod v 2-5°C, do 2 týdnů v -20°C
- Úprava vzorku
  - Optimální pH 6-8,5 (úprava HCl, NaOH)
  - Na litr vzorku vody přídavek 20 g NaCl, u brakických a slaných vod změřena salinita
  - U silně zakalených vzorků usazování 1 hod, případně odstředění nebo filtrace



# Postup

- Příprava zásobní suspenze
  - K lyofilizované kultuře bakterií je do temperovaných zkumavek přidána destilovaná voda → rehydratovaná suspenze
- Příprava zkušební suspenze (50:1)
  - A) Zkušební zkumavky – do vytemperovaných zkumavek je k médiu přidána zásobní suspenze
  - B) Enlenmayerova baňka – k médiu je přidána zásobní suspenze a ve stejném časovém intervalu pozdějšího měření intenzity je do temperovaných zkumavek odměřeno 500  $\mu$ l zkušební suspenze

# Postup zkoušky

- Vzorke z postupně celé ředící řady se vloží do luminometru (adaptace nejméně 15 minut) a měří se intenzita luminiscence jednotlivých vzorků a to ve stejných časových intervalech (doporučeno 20 s)
- Znovu se intenzita luminiscence měří po 15 a 30 min, popř. volitelně po 5 min

# Vyhodnocení

- Výpočet průměrného inhibičního účinku  $H_t$  v procentech (vzorce uvedené v normě).
- Stanovení hodnot EC (nejčastěji EC20 a EC50)

# Platnost zkoušky

- Hodnota  $f_{kt}$  pro 30 min inkubaci je v rozsahu 0,6 – 1,8
- Paralelní stanovení se neodchylují od svých průměrů o více jak 3 %.
- Tři srovnávací látky způsobují při 30 min expozici inhibici 20 – 80 % v následujících koncentracích:
  - 3,4 mg/l 3,5-dichlofenolu
  - 2,2 mg/l  $Zn^{2+}$  (jako heptahydrát síranu zinečnatého)
  - 18,7 mg/l  $Cr^{6+}$  (jako dichroman draselný)

# Protokol o zkoušce

- Identifikace vzorku vody, včetně podmínek vzorkování a doby a podmínek uchovávání
- Hodnotu PH původního vzorku
- Datum provedení zkoušky
- Úprava vzorku (pokud byla provedena)
- Původ bakterií, číslo šarže, datum přípravy bakterií popř. teplota uchování bakterií, pokud byly zmraženy
- Výsledky (dle kapitoly 10) + výsledky zkoušek se srovnávacími látkami
- Jakékoli odchylky