



Jakost vod – Stanovení
inhibičního účinku vzorků vod na
světelnou emisi
Vibrio fischeri

Zkouška na luminiscenčních
bakteriích – část 3:
metoda s lyofilizovanými
bakteriemi (ISO 11348-3:1998)



ISO 11348

- popisuje 3 metody stanovení inhibice luminiscence
- část 3:
popisuje metodu používající lyofilizované bakterie
- používaný organismus pro testování :
bakterie *Vibrio fischeri*
- použitelná pro: odpadní vody; vodné výluhy a průsakové vody; sladké, slané a brakické vody; pórovou vodu



Luminiscence

Definice:

schopnost živých organismů
(v důsledku chemické reakce)
produkovat světlo



Úvod

- rozdíly ve složení médií – vliv na citlivost testu
 - > média ovlivňují biologickou dostupnost toxických látek, emisi světla luminiscenčních bakterií
 - ⇒ **INTERPRETACE** výsledků: **POZOR!!!**
 - nutno brát zřetel na původ bakterií a způsob přípravy médií



Podstata zkoušky

- smíchání určených objemů zkoušených vzorku s bakteriální suspenzí
- sleduje se inhibice emise světla u *V.fischeri*
-> zkušební kritérium: snížení luminiscence (po expoziční době 15, 30 minut nebo volitelně po 5 minut)
- v úvahu se bere: korekční faktor (ukazatel změny intenzity kontrol během doby expozice)
- stanovují se hodnoty EC20 a EC50



Rušivé vlivy

- ne/rozpustnost látek
- barevnost/zakalenost (ztráta luminiscence v důsledku absorpce či rozptylu světla) – řešení dvoukomorová kyveta či provedení metody v kinetickém režimu tzv. FLASH metoda
- množství kyslíku- nízká koncentrace či vysoká spotřeba
- znečištění vzorku organickými živinami (močovina, pepton aj.)->snížení lum.
- hyperosmotický účinek (vysoká koncentrace solí = více než 30g/l)



Chemikálie a materiály

- zkušební bakterie (lyofilizované bakterie, uchování v mrazničce)
- roztok NaCl – ředící voda (20g/l)
- médium pro lyofilizované bakterie (NaCl + $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ + KCl + voda)
- srovnávací látky:
 - heptahydrát síranu zinečnatého
 - 3,5-dichlorfenol
 - dichroman draselný



Přístroje a pomůcky

- mraznička
- chladnička
- termoblok s řízenou teplotou
- luminometr
- pH-metr
- automatické pipety, stopky aj.



Odběr a úprava vzorků

- vzorky se odeberou do:
chemicky inertních a čistých nádob
- nádoby se naplní (zcela) a uzavřou
- vzorky se zkoušejí co nejdříve po odběru
- je-li nutné uchování:
 - při teplotě 2-5 st.C
(v temnu, skleněné nádoby, max 48 hodin)
 - při teplotě -20st.C (max 14 dní)



Nutnost úpravy vzorku???

pH

- těsně před samotným měřením
- pH vzorku mezi 6 – 8,5 – neupravuje se
- nutnost úpravy pH – na 7 +/- 0,2

salinita

- změření: konduktometr + v případě potřeby se vypočte množství NaCl potřebné k úpravě osmolarity

zakalenost

- silné zakalení: usazení (1 hod.) či odstředění, filtrace



Postup

- úprava vzorku
- příprava ředících řad

příprava zásobní suspenze

- rehydratace bakterií (vyjmutí z mrazničky a přidavek 1 ml destilované vody o teplotě 3 st.C), ne pipetou!!! kontakt bakterií s vodou naráz – přelití (omezení poškození buněk) – uchování při $t=3\pm 3$ st.C)

příprava zkušební suspenze

- čekání minimálně 5 minut

- A) příprava přímo ve zkušebních zkumavkách (500 ul média + 10 ul zásobních BAC)
- B) příprava v erlenmayerově baňce (50 dílů média + 1 díl zásobní BAC, pak rozpipetování do zkumavek po 500 ul BAC)
- promíchání



Postup zkoušky

- pracuje se s duplikáty
- adaptace alespoň 15 minut
- stejná doba expozice!!! – pracuje se v intervalu 20 sekund (pro přesné dodržení času expozice)
- zkumavka se zkušební suspenzí BAC ad A,B) -> změření luminiscence -> doplnění na objem 1 ml, promíchání -> expozice 15, 30 minut aj. -> opětovný záznam luminiscence po dané expozici

Vyhodnocení – inhibiční účinek 1)

- $f_{kt} = I_{kt}/I_0$ - výpočet korekčního faktoru

f_{kt} - slouží ke korekci počátečních hodnot I_0

I_0 - intenzita luminiscence kontrolní zkušební suspenze BAC před přidáním roztoku NaCl

I_{kt} - intenzita luminiscence kontrolní zkušební suspenze BAC po expozici 15, 30 minut

=> vypočte se průměr hodnot f_{kt} kontrolních vzorků

Vyhodnocení – inhibiční účinek 2)

- $I_{ct} = I_0 / \{f_{kt}\}$ – výpočet korigované hodnoty I_0
 $\{f_{kt}\}$ – průměr hodnot korekčního faktoru

- $H_t = [(I_{ct} - I_{Tt}) / I_{ct}] * 100$

H_t - inhibiční účinek zkoušeného vzorku po t expozici

I_{ct} - korigovaná hodnota I_0

I_{Tt} – intenzita luminiscence zkoušeného vzorku po expozici 15, 30 minut

-> pro každé řešení se vypočte průměrný inhibiční účinek



Vyhodnocení – inhibiční účinek 3) stanovení hodnot EC

- stanovení hodnot EC: lineární regresní analýza, vypočte se závislost účinku na koncentraci
- metodou nejmenších čtverců se vypočtou hodnoty EC20 a EC50 nebo lze hodnoty odhadnout graficky za použití logaritmických os



Platnost zkoušky

- je platná, když:
 - hodnota korekčního faktoru pro 30 minut inkubaci je v rozsahu 0,6 – 1,8
 - paralelní stanovení se neodchylují od svých průměrů o více než 3%
 - 3 srovnávací látky způsobují při 30 minutové expozici 20% - 80% inhibici