

Zkouška inhibice růstu *Pseudomonas putida*

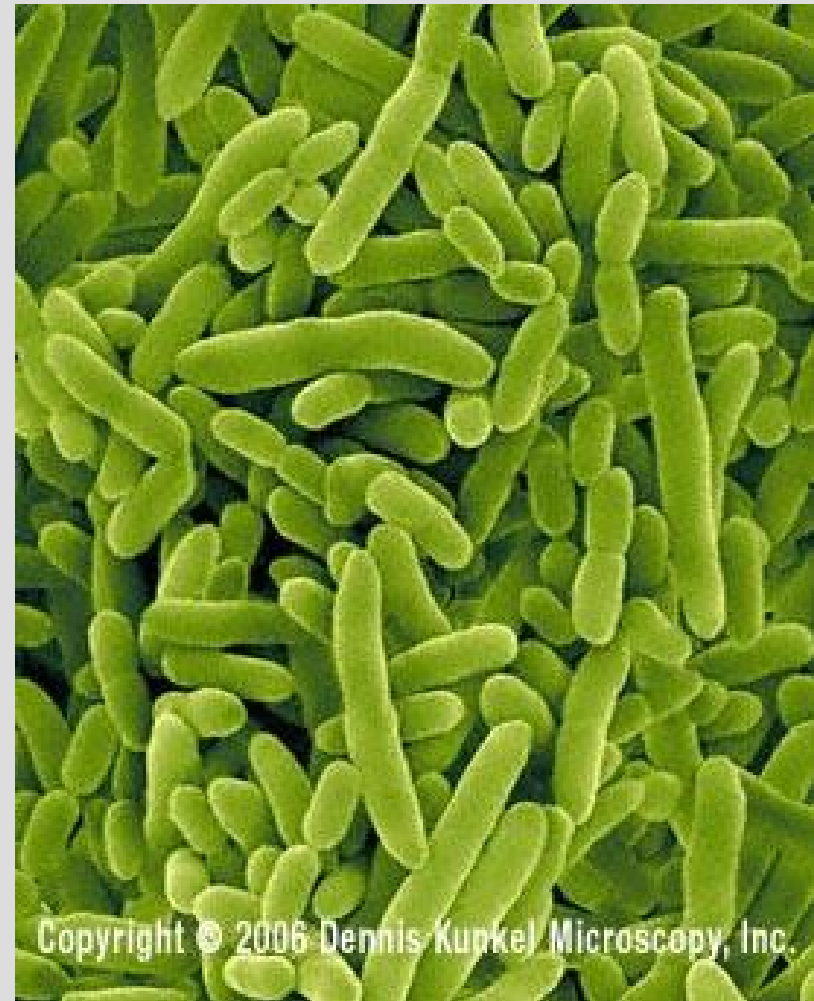
- Zkouška jakosti vody
- podle evropské normy EN ISO 10712:1995

P edm t zkouýky

- vliv povrchové, podzemní a odpadní vody na *Pseudomonas putida*
- metoda vhodná pro látky rozpustné ve vodě
- není vhodná pro silně zbarvené roztoky, s nerozpustnými nebo těžkými látkami a také látky, které reagují s živným roztokem
- výsledkem testu je IC10 a IC50

Zkuýební organismus

- Gramnegativní aerobní bakterie z řádu *Pseudomonadaceae*
- Mobilní tyčinky s polárními bičíky
- Vyskytuje se běžně v půdě a povrchových vodách
- Opt. teplota 25-30 stup. C
- V ČR lze získat vhodnou kulturu v České sbírce mikroorganismů (MU)
- Zásobní kultura se uchovává na zikmém agaru



Chemikálie a vybavení

- HCl/NaOH na případnou regulaci pH
- živné roztoky: roztok1 (NaNO₃, K₂HPO₄, KH₂PO₄, kvasni ní extrakt), roztok2 (NaNO₃, K₂HPO₄, KH₂PO₄), roztok3 (roztok glukózy), roztok4 (síran ho e natý a citronan sodný), roztoky se sterilizují
- živné médium (zásobní kultura): ve vodě se rozpustí 18g agaru a přidá se 50ml roztoku1, 125ml roztoku3, 100ml roztoku4 a doplní se do 1000ml vodou
- Média se rozdělí do zkumavek, vysterilizují a nechají ztuhnout v zikmé poloze

- spektrofotometr/turbidimetr
- Mikroskop s min.zvětšením 100x
- PH metr, autokláv, kultiva ní láhve
- Místnost s regulovatelnou stálou teplotou

Zpracování vzork

- Zpracování v testu co nejdříve po odebrání
- Je-li to nutné, lze vzorky konzervovat:
 - Chlazením (na 2-4 stupň , do dvou dn)
 - Mražením (na -18 stup , do dvou týdn)
- Před přípravou zkuzebního média se vzorek protřepe a případně homogenizuje
- Pokud má vzorek extrémní pH, upraví se v dodatečné zkouzce na 7,4

Postup zkoušky

- Předkultivační médium: do 900ml vody se přidá 25ml roztok 1-3 a 50ml roztoku 4
- Inokulum: buňky se spláchnou ze zikmého agaru a edním se upraví hustota buněk na 10 ZF (formazinová jednotka zákalu)
- Inokulum se inkubuje v kultivačních lahvích po 5 hodin za teploty testu
- Buňky musí být v exponenciální fázi růstu a nesmí být přítomno etzení
- Po skonění inkubace se bakteriální suspenze zedí do požadované hustoty

Postup zkoušky II

- Zkušební kultura: 10ml inokula, 5ml roztoku 3 a 2,5 ml roztok 1 a 2, 80 ml zkušebního roztoku/ edicí vody na 100ml
- Kontrola s 80ml edicí vody
- Max. koncentrace zkoušeného roztoku v dávce je 80%
- Každá z koncentrací ve třech opakováních

- Inkubace v temnu při 23 ± 1°C
- Bakterie se udržují v suspenzi

- Po 16ti hodinách ± 1hodina se měří po homogenizaci protředím zákal na spektrofotometru při 436nm

Platnost zkoušky a výpočet

- V kontrole se buňky pomnoží faktorem nejmén 60
- EC50 referenční látky 3,5-dichlorofenolu je 10-30mg/l
- Procentuální inhibice r_{st}u:
 - $I = (B_c - B_n) / (B_c - B_o) * 100$
- I . inhibice r_{st}u buněk v procentech
- B_n . základ biomasy v měření na konci testu
- B_c . základ biomasy v kontrole na konci testu
- B_o . poáteční základ biomasy v úse 0
- IC 10 a 50 se vypočte z grafu inhibice r_{st}u proti odpovídajícímu úřední vzorku

D kuji za pozornost :-)

