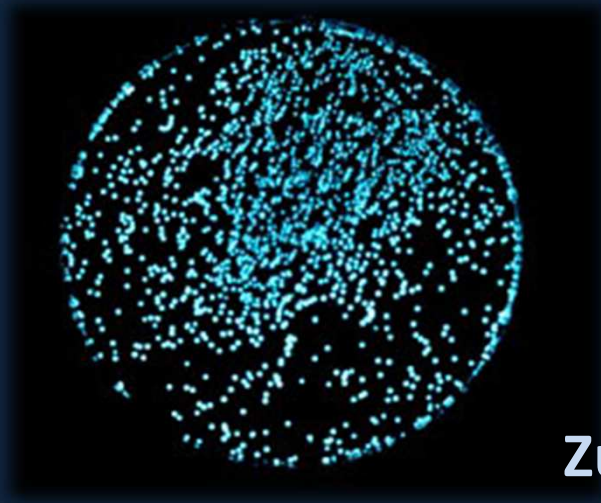


# ISO 11348 – 3 (1998)

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



Zuzana Šalplachtová & Šárka Křepelková

# PRINCIP

- Metoda stanovení inhibice luminiscence emitované mořskými bakteriemi *Vibrio fischeri* s využitím lyofilizovaných bakterií.
- Zkušebním kritériem je snížení luminiscence po expozici 15 min a 30 min, nebo volitelně po 5 min.
- Hodnotí se **korekční faktor**  $f_{kt}$ , který je měřítkem změn intenzity kontrol během doby expozice.
- Pomocí koncentračních řad je možné stanovit **inhibiční účinek** vzorku vody jako **LID** (nejnižší neúčinné ředění) nebo jako hodnoty **EC<sub>20</sub>** popř. **EC<sub>50</sub>**.
- Metoda je použitelná pro:



## RUŠIVÉ VLIVY

- Nerozpustné, málo rozpustné nebo těkavé látky.
- Silně zbarvené nebo zakalené vzorky.
- Vzorky znečištěné organickými látkami .
- Vzorky s vysokými koncentracemi solí.

Některé z nich mohou být kompenzovány nastavením metodiky měření.

## VZORKY

- Odběr vzorků se provádí dle normy ISO 5667 – 16.
- Je třeba upravit pH, u vzorků slaných vod osmolaritu a zakalené vzorky se filtrují nebo nechají usadit.

## PŘÍPRAVA ZÁSObNÍ SUSPENZE

- Ředící řady vzorku, ředící voda a kontrolní vzorky s roztokem NaCl se nechají temperovat na  $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- K ampulím s lyofilizovanou kulturou se přidá 1 ml ochlazené destilované vody
- Rehydratovaná suspenze luminiscenčních bakterií slouží jako zásobní suspenze a uchovává se při teplotě  $3\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$
- Po 5 min lze ze zásobní suspenze připravit zkušební suspenze.

# PŘÍPRAVA ŘEDICÍ ŘADY

Tabulka B.1 - Příprava řad ředění - Složení zkoušených roztoků a kontrol

Ředění	Ředění D	Vzorek μl	Ředicí voda μl (5.2)	Zásobní suspenze μl (8.4)
1 v 1,25	1	800	-	200
1 ve 2	2	500	-	500
1 ve 3	3	333,3	166,7	500
1 ve 4	4	250	250	500
1 v 6	6	166,7	333,3	500
1 v 8	8	125	375	500
1 ve 12	12	83,3	416,7	500
1 v 16	16	62,5	437,5	500
1 v 24	24	41,7	458,3	500
1 v 32	32	31,3	468,7	500
Kontroly pro D = 1		-	800	200
pro D ≥ 2		-	500	500

# PŘÍPRAVA ZKUŠEBNÍ SUSPENZE

## VARIANTA 1

- přímo ve zkušebních zkumavkách
- do vytemperovaných zkumavek s 500  $\mu\text{l}$  média se ve stejných časových intervalech, v jakých se bude měřit, přidá 10  $\mu\text{l}$  zásobní suspenze

## VARIANTA 2

- suspenze se připraví s Erlenmeyerově baňce
- k 50 objemovým dílům média se přidá 1 objemový díl zásobní suspenze
- ve stejných časových intervalech, v jakých se bude měřit, se do zkumavek odměří 500  $\mu\text{l}$  zkušební suspenze

# POSTUP

Pro každé ředění se připraví duplikáty.

Měření intenzity luminiscence zkušební suspenze  $I_0$  v časových intervalech 20 s.

Přidání vzorku nebo kontrolního vzorku NaCl ke zkušební suspenzi a doplnění na objem 1 ml.

Opakování ve stejných časových intervalech (20 s) s dalšími vzorky.

Intenzita luminiscence ve všech zkumavkách (včetně kontrol) se stanoví a zaznamená po 15 a 30 min ( $I_{15}$ ,  $I_{30}$ ), nebo volitelně po 5 min.

# VYHODNOCENÍ

## 1. INHIBIČNÍ ÚČINEK NA LUMINISCENČNÍ BAKTERIE

- Ze změřené intenzity luminiscence vypočítáme korekční faktor  $f_{kt}$ , který slouží ke korekci počátečních hodnot  $I_0$  :

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0} \quad (t = 5 \text{ min, } 15 \text{ min, } 30 \text{ min}) \quad (1)$$

kde  $f_{kt}$  je korekční faktor pro expozici 5 min, 15 min nebo 30 min;

$I_{kt}$  intenzita luminiscence kontrolního vzorku po expozici 15 min nebo 30 min, v relativních jednotkách luminiscence;

$I_0$  intenzita luminiscence kontrolní zkušební suspenze bezprostředně před přidáním ředící vody (5.2), v relativních jednotkách luminiscence.

- Vypočítáme  $I_{ct}$  (korigovaná hodnota  $I_0$  pro zkumavky se vzorkem):

$$I_{ct} = I_0 \cdot \overline{f_{kt}} \quad (2)$$

kde  $\overline{f_{kt}}$  je průměr hodnot  $f_{kt}$ ;

$I_0$  [viz rovnice (1)];

$I_{ct}$  korigovaná hodnota  $I_0$  pro zkumavky se zkušným vzorkem bezprostředně před přidáním zkušného vzorku.



- Inhibiční účinek vzorku se stanoví podle rovnice:

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_{Tt}}{I_{ct}} \times 100 \quad (3)$$

kde  $H_t$  je inhibiční účinek zkoušeného vzorku po expozici 15 min nebo 30 min, v procentech;

$I_{ct}$  [viz rovnice (2)];

$I_{Tt}$  intenzita luminiscence zkoušeného vzorku po expozici 15 min nebo 30 min, v relativních jednotkách luminiscence.

- Pro vyhodnocení závislosti účinků na koncentracích se pro každé ředění vypočítá hodnota gama  $\Gamma$ :

$$\Gamma_t = \frac{\overline{H_t}}{100 - \overline{H_t}} \quad (4)$$

kde  $\Gamma_t$  je hodnota gama zkoušeného vzorku po expozici 15 min nebo 30 min;

$\overline{H_t}$  průměr hodnot  $H_t$  [viz rovnice (3)].

## 2. STANOVENÍ HODNOT $EC_x$

- Pomocí lineární regresní analýzy
- Závislost účinku na koncentraci je popsána lineární rovnicí:

$$\lg c_t = b \lg I_t + \lg a \quad (5)$$

kde  $c_t$  je podíl vzorku vody ve zkoušeném roztoku v procentech;

$I_t$  [viz rovnice (4)];

$b$  směrnice popisované přímky;

$\lg a$  úsek na ose  $y$  vymezený popisovanou přímkou.

- Hodnoty  $EC_{20}$  a  $EC_{50}$  se vypočítají metodou nejmenších čtverců s intervaly spolehlivosti:

$$c_t = EC_{20,t} \text{ pro } I_t = 0,25;$$

$$c_t = EC_{50,t} \text{ pro } I_t = 1,00.$$

# PLATNOST ZKOUŠKY

- hodnota  $f_{kt}$  pro 30 min inkubaci je v rozsahu 0,6 až 1,8
- paralelní stanovení kontrol i zkušebních vzorků se neodchyluje od svých průměrů o více než 3%
- tři srovnávací látky způsobují při 30 min expozici inhibici 20% až 80% v daných koncentracích

DĚKUJEME  
ZA POZORNOST...

