Praktické cvičení z předmětu Biosenzory a monitorování životního prostředí, letní semestr 2023.

**Detekce kontaminace vody toluenem pomocí bioluminiscenčního bioreportéru *Pseudomonas putida* TVA8 v mikrotitrační destičce**.

Biolumiscenční bioreportér *Pseudomonas putida* TVA8 je geneticky upravený mikroorganismus, který produkuje bioluminiscenci v přítomnosti toluenu, benzenu a podobných látek. Detaily genetické úpravy bioluminiscenčních bioreportérů byly popsány v samostatné přednášce.

Zadání úlohy:

Změřte luminiscenční odezvu a nárůst bioluminiscenčního bioreportéru *Pseudomonas* fluorescens TVA8 při koncentraci buněk 109, 108, 107 CFU, na toluen v koncentraci 0 – 0,027 g/100ml.

Obsah praktického cvičení:

1. Seznámení s bezpečnostními předpisy pro uzavřené nakládání s geneticky upravenými mikroorganismy (GMO), platnými v laboratoři.
2. Praktické seznámení s přístroji, které se budou používat: flow box, spektrofotometr s kyvetou, třepačka, parní sterilizátor, odstředivka, destičkový spektrofotometr Omega. (Návody k přístrojům jsou přílohou zadání praktického cvičení.)
3. Nácvik pipetování do destičky.
4. Příprava toluenových roztoků.
5. Příprava buněk pro pipetování do destičky. \*a) Měření optické density (OD),

\*b) přenesení inokula‚ do čerstvého media (1 ml do 50 ml),

\*c) kultivace na třepačce (cca 3 hod.),

d) měření OD,

e) výpočet ředění buněk pro pipetování do destičky,

f) ředění buněk ve flow boxu,

1. Pipetování medii a buněk do 96 jamkové mikrotitrační destičky. Pipetuje se v pořadí minerální medium (MSM), živné medium (LB), roztok toluenu, znečištěná voda, podle zadání.
2. Překrytí destičky folii propouštějící kyslík a umístění destičky do přístroje. Spuštění přístroje.
3. Přístroj měří podle programu luminiscenci a absorbanci v každé jamce každých 15 minut po dobu 16 hodin. Druhý den ráno se výsledky stáhnou do excelu, včetně zobrazení průběhu. V tomto praktickém cvičení bude doba měření zkrácena na 4 hodiny.
4. Sepsání protokolu.

\*Bude už připraveno před začátkem laboratorního cvičení (nedostatek času vzhledem ke státnímu svátku v pondělí).