

REF 945025

05.23

de

BioFix® Lumi Leuchtbakterien, flüssiggetrocknet nach DIN EN ISO 11348-2

Methode:

Bestimmung der akuten Toxizität auf **flüssiggetrocknete** Leuchtbakterien nach DIN EN ISO 11348-2. Messgröße ist die natürliche Leuchtleistung (Lumineszenz) des eingesetzten Mikroorganismus *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Ermittelt wird die Hemmung der Leuchtintensität durch die Probe im Vergleich zu einem ungehemmten Kontrollansatz. Die Höhe der Hemmung der Leuchtintensität in der Probe ist ein Maß für deren Toxizität.

Anwendungsbereich:

Kommunales und industrielles Abwasser, Oberflächenwasser, wässrige Eluate von Böden, Abfall und Altlasten

Messbereich:

0 – 100% Hemmung

Angabe der Ergebnisse:

- **% Hemmung** der Leuchtintensität in der Probe im Vergleich zu einer ungehemmten Kontrolle
- **G_L-Wert** (nach DIN EN ISO 11348-2: **LID-Wert**): Kehrwert der ersten Verdünnungsstufe einer Probe, bei der die Hemmung der Leuchtintensität weniger als 20% beträgt.
- **EC_{xx}**: Konzentration einer Probe, die eine Hemmung der Leuchtintensität von genau xx% verursacht (z.B. EC50-Wert: Konzentration der Probe, die eine Hemmung der Leuchtintensität von 50% hervorruft).
- **TU-Werte** („Toxicity units“ nach Definition der amerikanischen Umweltschutzbehörde U.S. EPA): 100 geteilt durch EC50-Wert.

Inhalt Reagenziensatz:

10 Röhrchen mit flüssiggetrockneten Leuchtbakterien nach DIN EN ISO 11348-2

10 Röhrchen mit „BioFix® Lumi Reaktivierungslösung“ nach DIN EN ISO 11348-2, fertig portioniert

1 Röhrchen mit gebrauchsfertiger NaCl-Standardlösung

Gefahrenhinweise:

Dieses Testkit enthält keine kennzeichnungspflichtigen Gefahrstoffe.

Der Leuchtbakterienstamm *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 ist noch nie als Krankheitserreger in Erscheinung getreten. Nach Merkblatt B006 1/92 ZH 1/346 der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie ist *Vibrio fischeri* in die Risikogruppe 1 eingeordnet, d. h. es besteht kein Risiko für den Menschen und für Wirbeltiere.

Lagerung:

Die Testreagenzien sind bei -20 ± 2 °C bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum haltbar. Die flüssiggetrockneten Leuchtbakterien erst unmittelbar vor der Reaktivierung dem Gefrierfach entnehmen und auftauen. Reaktivierte Leuchtbakterien sollten möglichst innerhalb von 4 Stunden aufgebraucht werden! Eine Zwischenlagerung der reaktivierten Leuchtbakterien darf nur im unverdünnten Zustand (siehe Arbeitsschritt 1) im Kühlschrank bei +2 °C bis +8 °C erfolgen.

Mit fortschreitender Aufbewahrungszeit der reaktivierten Leuchtbakterien kann es zu einer Abnahme der natürlichen Leuchtintensität und zu einer Verschiebung des Empfindlichkeitsspektrums kommen.

Ein Wiedereinfrieren reaktiver Leuchtbakterien ist nicht zu empfehlen und unterliegt nicht den Garantieleistungen von MACHEREY-NAGEL.

Reaktivierung und Dosierung der flüssiggetrockneten BioFix® Lumi Leuchtbakterien:

Die **Reaktivierung** flüssiggetrockneter BioFix® Lumi Leuchtbakterien erfolgt testunabhängig immer auf die gleiche Art und Weise. Die **Dosierung** der resuspendierten Leuchtbakterien hängt von der wahlweisen Testdurchführung des Leuchtbakterientestes nach DIN EN ISO 11348-2 ohne Messung von GL1 (Arbeitsschritt 2.1) oder mit Messung von GL1 (Arbeitsschritt 2.2) ab.

Wichtiger Hinweis:

Details zur weiteren Testdurchführung sind den Anleitungen und Handbüchern der jeweils verwendeten Luminometer zu entnehmen!

Arbeitsschritt 1: Reaktivierung
1. „BioFix® Lumi Reaktivierungslösung“ dem Tiefkühlfach entnehmen, auftauen und in einem geeigneten Thermoblock auf +15 °C temperieren.
2. Ein tiefgefrorenes Röhrchen mit BioFix® Lumi Leuchtbakterien unmittelbar vor der Reaktivierung dem Tiefkühlfach entnehmen und Zugabe von 1 mL „BioFix® Lumi Reaktivierungslösung“.
3. Leuchtbakterien im Wasserbad (Raumtemperatur) 2 min auftauen und lösen .
4. Anschließend das Röhrchen mit den resuspendierten Leuchtbakterien in einem geeigneten Thermoblock 15 min bei +15 °C temperieren.

Arbeitsschritt 2.1: Dosierung bei Messung <u>ohne</u> GL1
1. Die resuspendierten Leuchtbakterien mit der verbliebenen „BioFix® Lumi Reaktivierungslösung“ mischen .
2. In jede bereitgestellte Testansatz-Küvette 0,5 mL der reaktivierten Leuchtbakteriensuspension vorlegen.
3. Für 15 min bei +15 °C temperieren.
4. Teststart durch Messung des Ausgangsleuchtens I₀ .
Details zur weiteren Testdurchführung sind den Anleitungen und Handbüchern der jeweils verwendeten Luminometer zu entnehmen.

oder

Arbeitsschritt 2.2: Dosierung bei Messung <u>mit</u> GL1
1. Zugabe von 2 mL „BioFix® Lumi Reaktivierungslösung“ zu den resuspendierten Leuchtbakterien und gut mischen.
2. Je 0,2 mL dieser Suspension in die Testansatz-Küvetten zur GL1-Bestimmung (Kontrolle <u>und</u> Probenansatz) vorlegen.
3. Die verbliebenen resuspendierten Leuchtbakterien mit der verbliebenen „BioFix® Lumi Reaktivierungslösung“ mischen.
4. In die restlichen, bereitgestellten Testansatz-Küvetten jeweils 0,5 mL der reaktivierten Leuchtbakteriensuspension vorlegen.
5. Für 15 min bei +15 °C temperieren.
6. Teststart durch Messung des Ausgangsleuchtens I₀ .
Details zur weiteren Testdurchführung sind den Anleitungen und Handbüchern der jeweils verwendeten Luminometer zu entnehmen.

Analytische Qualitätssicherung:

In der DIN EN ISO 11348-2 wird die Einhaltung bestimmter Gültigkeitskriterien gefordert. Mit dem beigefügten Prüfzertifikat wird von MACHEREY-NAGEL die Einhaltung der geforderten Gültigkeitskriterien garantiert. Zur Eigenkontrolle und Überprüfung der korrekten Funktionsweise des Testsystems kann auch vom Anwender selbst vor Ort eine Kontrollmessung mit den in der Norm genannten Standardlösungen durchgeführt werden. Die hierzu notwendigen Informationen wie Standardsubstanzen und Testkonzentrationen sind dem beiliegenden Prüfzertifikat zu entnehmen.

Eine von der Norm unabhängige Prüfung kann mit Hilfe der beiliegenden gebrauchsfertigen NaCl-Standardlösung durchgeführt werden. Eine Mischung von 0,5 mL dieser Standardlösung mit 0,5 mL resuspendierten Leuchtbakterien (nach Arbeitsschritt 2.1) ergibt nach 30 min Inkubation bei +15 °C eine Hemmung der Leuchtintensität von 40% bis 60%.

pH-Wert:

Gemäß der DIN EN ISO 11348-2 ist bei einem pH-Wert der Probe von 6,0 bis 8,5 keine pH-Korrektur notwendig. Liegt der pH-Wert der Probe außerhalb des genannten Bereiches muss dieser auf einen Wert von 7,0 ± 0,2 eingestellt werden. pH-Werte von kleiner 6,0 oder größer 8,5 können zu pH-bedingten Leuchthemmungen führen.

Störungen:

Nicht gelöste, schwer lösliche oder flüchtige Stoffanteile oder Stoffe, die mit dem Verdünnungswasser oder der Testsuspension reagieren oder während des Tests ihren Zustand ändern, können das Testergebnis verfälschen oder die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse beeinträchtigen.

Bei stark gefärbten oder trüben Proben können Lichtverluste durch Absorption oder Lichtstreuung eintreten. Mit Hilfe von Farbkorrekturküvetten (REF 940006) können diese Störungen nach dem in der Norm DIN EN ISO 11348-2, Anhang A beschriebenen Verfahren kompensiert werden. Bei stark sauerstoffzehrenden Proben kann der für die Biolumineszenz erforderliche Sauerstoff (> 0,5 mg/L) fehlen. Dies kann Leuchthemmungen verursachen, die nicht auf Toxizität zurückzuführen sind.

Bei organischer Belastung der Wasserprobe mit biologisch leicht abbaubaren Nährstoffen kann ein nicht durch Schadstoffe bedingter Verlust der Leuchtintensität auftreten.

NaCl-Konzentrationen in der Probe von kleiner 15 g/L (1,5%) oder größer 50 g/L (5%) bzw. deren Osmolaritätsäquivalenten führen zu osmotisch bedingten Leuchthemmungen.

Entsorgung:

Leuchtbakterien und Testansätze können problemlos über den Ausguß entsorgt werden. Einschränkungen können entstehen, wenn die **Probe** gesundheitsgefährdende oder giftige, speziell entsorgungspflichtige Substanzen enthält. Für die ordnungsgemäße Entsorgung solcher Testansätze ist der Anwender gemäß den jeweils dafür gültigen Richtlinien und Bestimmungen selbst verantwortlich.

Literatur:

DIN EN ISO 11348-2: Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest); Teil 2: Verfahren mit flüssiggetrockneten Bakterien AQS-Merkblatt für die Qualitätssicherung bei Wasser-, Abwasser- und Schlammentersuchungen der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) P-9/5

BioFix® Lumi Luminescent Bacteria, liquid-dried according to DIN EN ISO 11348-2

Method:

Determination of the acute toxicity of **liquid-dried** luminescent bacteria according to DIN EN ISO 11348-2. The measuring unit is the natural light output (luminescence) of the microorganism *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Obtained will be the level of inhibition of the light intensity in the sample in comparison to an uninhibited control. The level of inhibition of the light intensity in the sample is a measure of its toxicity.

Area of application:

Communal and industrial waste water, surface waters, aqueous eluates from soils, waste and polluted sites

Measurement range:

0 – 100 % inhibition

Specifications of the results:

- % **Inhibition** of the light intensity in the sample in comparison to an uninhibited control
- **G_L-Value** (according to DIN EN ISO 11348-2: **LID-Value** = Lowest Ineffective Dilution): Reciprocal value of the first dilution of a sample that causes an inhibition of the light intensity of less than 20 %.
- **ECXX**: Concentration of a sample that causes an inhibition of the light intensity of exactly xx % (e.g. EC50-Value: Concentration of the sample that causes an inhibition of the light intensity of 50 %)
- **TU-Values** (Toxicity Units according to the definition of the American Environmental Protection Agency U.S. EPA): 100 divided by EC50-Value

Content of the test kit:

10 vials with liquid-dried luminescent bacteria according to DIN EN ISO 11348-2
 10 vials with „BioFix® Lumi Reactivation Solution“ according to DIN EN ISO 11348-2, portioned ready-to-use
 1 flask with ready-to-use sodium chloride standard solution

Hazard warnings:

The test kit does not contain any designated hazardous materials.
 The luminescent bacteria strain *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 has never been identified as a pathogen. According to the data sheet B006 1/92 ZH 1/346 of the society of the chemical industry, *Vibrio fischeri* is classed in risk group 1, i.e. it does not pose any risk to humans or vertebrates.

Storage:

The test reagents can be kept at -20 ± 2 °C until the date indicated on the packaging. First remove the liquid-dried luminescent bacteria from the freezer and thaw out immediately before the reactivation.
 Reactivated luminescent bacteria should be used up within at least 4 hours! Intermediate storage of reactivated luminescent bacteria must only be in undiluted state (see step 1) in a fridge at +2 °C to +8 °C.
 Prolonged storage time of the reactivated luminescent bacteria can lead to a reduction in the natural light intensity and an alteration of the sensitivity spectrum. Re-freezing reactivated luminescent bacteria is not recommended and is not subject to the guarantee obligations of MACHEREY-NAGEL.

Reactivation and dosage of the liquid-dried BioFix® Lumi luminescent bacteria:

The **reactivation** of liquid-dried BioFix® Lumi Luminescent Bacteria is always done using the same method regardless of the test. The **dosage** of the resuspended luminescent bacteria depends on the optional test method of the luminescent bacteria test according to DIN EN ISO 11348-2 without measuring GL1 (step 2.1) or with measuring GL1 (step 2.2).

Important note:

Further details for performing luminescent bacteria toxicity tests can be found in the instructions and manuals of the luminometer used!

Step 1: Reactivation

1. Remove a deep frozen vial of „BioFix® Lumi Reactivation Solution“, thaw out, and maintain a temperature of **+15 °C** in a suitable thermoblock.
2. Remove a deep frozen vial with **BioFix® Lumi luminescent bacteria** from the freezer immediately before the reactivation and **add 1 mL „BioFix® Lumi Reactivation Solution“**
3. Defrost and dissolve the luminescent bacteria in a water bath (room temperature) for **2 min.**
4. Then place the vial with the resuspended luminescent bacteria in a suitable thermoblock and maintain a temperature of **+15 °C for 15 min.**

Step 2.1: Dosage for measurement without GL1

1. **Mix** the resuspended luminescent bacteria **with the remaining „BioFix® Lumi Reactivation Solution“**.
2. Transfer **0.5 mL** of the **reactivated luminescent bacteria suspension** to each provided cuvette.
3. Maintain at +15 °C for 15 min.
4. Start the test by **measuring the initial light intensity I₀**.

Details for further performance of the test procedure has to be found in the instructions and manuals of the luminometer used.

or

Step 2.2: Dosage for measurement with GL1

1. Add 2 mL of „BioFix® Lumi Reactivation Solution“ to the resuspended luminescent bacteria and mix well.
2. Place **0.2 mL** of this suspension in the **test cuvettes for GL1 calculation** (control and sample mixtures).
3. Mix the remaining resuspended luminescent bacteria with the remaining „BioFix® Lumi Reactivation Solution“.
4. In the remaining test cuvettes provided, transfer **0.5 mL** of the **reactivated luminescent bacteria suspension**.
5. Maintain at **+15 °C for 15 min.**
6. Start the test by **measuring the initial light intensity I₀**.

Details for further performance of the test procedure has to be found in the instructions and manuals of the luminometer used.

Analytical quality assurance:

In the DIN EN ISO 11348-2, it is required that specific criteria are observed for validity. The accompanying MACHEREY-NAGEL test certificate guarantees that the required criteria have been observed.

To control and check the correct functionality of the test system, the user may also carry out a control measurement on-site with the standard solutions listed in the standard. The information such as standard substances and test concentrations necessary to do this can be found in the accompanying test certificate.

A test independent of the standard according to DIN EN ISO 11348-2 can be carried out using the accompanying ready-to-use sodium chloride standard solution. Mixing 0.5 mL of this standard solution with 0.5 mL resuspended luminescent bacteria (in accordance with step 2.1) results in a 40 % to 60 % inhibition of the light intensity after 30 min incubation at + 15 °C.

pH-Value:

According to the DIN EN ISO 11348-2, no pH correction is necessary with a sample pH value of 6.0 to 8.5. If the sample's pH value is outside this range, it must be adjusted to a value of 7.0 ± 0.2. pH values below 6.0 or greater than 8.5 can lead to pH induced light inhibitions

Interferences:

Non-dissolved, difficult to dissolve or volatile compounds or substances, which react with the diluent or the test suspension, or change their state during the test, can falsify the test result or affect the ability to reproduce the test results.

With strong coloured or cloudy samples, light losses can occur due to absorption or light scattering effects. By using colour correction cuvettes (REF 940006), these interferences can be compensated following the method described in the standard DIN EN ISO 11348-2, Appendix A. In very oxygen deficient samples, the oxygen necessary for the bioluminescence (> 0.5 mg/L) may be lacking. This can cause light inhibitions, which are not caused by toxicity.

If the water sample is exposed to organic substances with easily bio-degradable nutrients, a loss in light intensity may occur which is not caused by toxic matter. NaCl concentrations in the sample of less than 15 g/L (1.5 %) or greater than 50 g/L (5 %) or their osmolarity equivalents can cause osmotically induced light inhibitions.

Disposal:

It is perfectly safe to dispose of luminescent bacteria and test mixtures down the drain. There may be restrictions if the sample itself contains substances harmful to health or are poisonous and subject to specific disposal requirements. The user is personally responsible for the proper disposal of such test mixtures according to the relevant guidelines and regulations.

Literature:

DIN EN ISO 11348-2: Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test); Part 2: Method using liquid-dried bacteria AQS Data Sheet for Quality Assurance in Water, Waste Water and Silt Tests by the Federal Work Community Water of Germany (LAWA) P-9/5

REF 945025

05.23

fr

BioFix® Lumi Bactéries Luminescentes, déshydratées conforme à la norme DIN EN ISO 11348-2

Méthode :

Détermination de la toxicité aiguë via bactéries luminescentes **déshydratées** en conformité avec la norme DIN EN ISO 11348-2. L'échelle de mesure est représentée par le pouvoir luminescent naturel (luminescence) des micro-organismes utilisés, le *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. L'inhibition de la luminescence est déterminée par l'échantillon d'eau en comparaison à une préparation de contrôle non inhibée. Le degré d'inhibition de la luminescence de l'échantillon sert de valeur de référence à sa toxicité.

Domaines d'utilisation :

Eaux usagées communales et industrielles, eaux de surface, effluents aqueux de sols, de déchets et de sites pollués.

Echelle de mesure :

0 – 100 % d'inhibition

Indication des résultats :

– % d'**inhibition** de la luminescence de l'échantillon en comparaison à une préparation de contrôle non inhibée
– **Valeur GL** (selon la norme DIN EN ISO 11348-2 : valeur LID) : Valeur réciproque du premier degré de dilution d'un échantillon chez lequel l'inhibition de la luminescence atteint moins de 20 %.

– **ECXX** : Concentration d'un échantillon qui entraîne une inhibition de la luminescence d'exactly xx % (par exemple valeur EC50 : Concentration de l'essai qui entraîne une inhibition de la luminescence de 50 %).

– **Valeurs TU** („Toxicity Units” selon la définition de l'administration américaine de l'environnement U.S. EPA) : 100 divisé par la valeur EC50).

Contenu du set de réactifs :

10 tubes de bactéries luminescentes déshydratées selon la norme DIN EN ISO 11348-2

10 tubes de „BioFix® Lumi Solution de Réactivation” selon la norme DIN EN ISO 11348-2, pré-dosée

1 tube de solution standard prête à l'emploi (NaCl).

Indications de danger :

Ce kit de test ne contient pas de matières dangereuses soumises à déclaration.

La souche de bactéries luminescentes *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 n'est encore jamais apparue comme étant pathogène. Selon la fiche technique B006 1/92 ZH 1/346 de la caisse allemande de prévoyance professionnelle de l'industrie chimique, *Vibrio fischeri* a été classée dans le groupe de risque 1, c'est à dire qu'elle ne représente aucun danger pour l'homme ni les animaux vertébrés.

Stockage :

Les réactifs de test se conservent à -20 °C ± 2 °C jusqu'à la date limite de conservation indiquée sur l'emballage. Ne sortir les bactéries luminescentes du congélateur et les décongeler qu'immédiatement avant la réactivation. Utiliser les bactéries luminescentes réactivées si possible dans un délai de 4 heures ! Un stockage intermédiaire des bactéries luminescentes réactivées ne doit avoir lieu qu'en état non dilué (voir démarche 1) dans le réfrigérateur à une température comprise entre +2 °C et +8 °C.

Une durée croissante de stockage des bactéries luminescentes réactivées peut entraîner une baisse de la luminescence naturelle et un report du spectre de sensibilité. Une recongélation de bactéries luminescentes réactivées n'est pas recommandée et n'est pas incluse dans la garantie de MACHEREY-NAGEL.

Réactivation et dosage des BioFix® Lumi Bactéries Luminescentes Déshydratées:

La **réactivation** des BioFix® Lumi Bactéries Luminescentes Déshydratées s'effectue toujours de la même manière, indépendamment du test. Le **dosage** des bactéries luminescentes remises en suspension dépend du déroulement du test des bactéries luminescentes selon la norme DIN EN ISO 11348-2 soit sans mesure de la valeur GL 1 (démarche 2.1) soit avec mesure de la valeur GL1 (démarche 2.2).

Remarque importante :

Pour de plus amples détails concernant le déroulement du test, veuillez vous référer au mode d'emploi et au manuel du luminomètre utilisé !

Démarche 1 : Réactivation
1. Sortir la „BioFix® Lumi Solution de Réactivation” du congélateur, la laisser décongeler et la tempérer à +15 °C dans un aérotherme adapté.
2. Sortir un tube congelé de BioFix® Lumi Bactéries Luminescentes du congélateur immédiatement avant la réactivation et y ajouter 1 mL de „BioFix® Lumi Solution de Réactivation” .
3. Faire décongeler les bactéries luminescentes au bain-marie (à température ambiante) 2 minutes et les dissoudre.
4. Puis tempérer le tube avec les bactéries luminescentes resuspendues dans un aérotherme adapté pendant 15 minutes à +15 °C .

Démarche 2.1 : Dosage pour une mesure <u>sans</u> GL1
1. Mélanger les bactéries luminescentes resuspendues avec le reste de la „BioFix® Lumi Solution de Réactivation”.
2. Disposer 0,5 mL de la suspension de bactéries luminescentes réactivée dans chacune des cuvettes de préparation de test livrées.
3. Et tempérer pendant 15 minutes à +15 °C .
4. Le test débute en mesurant la luminosité de départ I₀ .
Pour de plus amples détails concernant le déroulement du test, veuillez vous référer au mode d'emploi et au manuel du luminomètre utilisé !

ou

Démarche 2.2 : Dosage pour une mesure <u>avec</u> GL1
1. Ajouter 2 mL de „BioFix® Lumi Solution de Réactivation” aux bactéries luminescentes resuspendues et bien mélanger.
2. Disposer 0,2 mL de cette suspension dans chaque cuvette de préparation de test pour déterminer la valeur GL1 (préparation de contrôle <u>et</u> l'échantillon).
3. Mélanger les bactéries luminescentes resuspendues restantes avec le reste de la „BioFix® Lumi Solution de Réactivation”.
4. Disposer 0,5 mL de la solution resuspendue de bactéries luminescentes dans chacune des cuvettes de préparation de test restantes.
5. Et tempérer pendant 15 minutes à +15 °C .
6. Le test débute en mesurant la luminosité de départ I₀ .
Pour de plus amples détails concernant le déroulement du test, veuillez vous référer au mode d'emploi et au manuel du luminomètre utilisé !

Assurance qualité analytique :

La norme DIN EN ISO 11348-2 requiert l'application de certains critères de validité. Le certificat de contrôle ci-joint garantit le respect par MACHEREY-NAGEL des critères de validités requis. L'utilisateur a également la possibilité d'effectuer sur place un contrôle avec les solutions standards citées par la norme dans le but d'un auto-contrôle et pour vérifier le fonctionnement correct du système de test. Les informations nécessaires ainsi que les substances standards et les concentrations de test se trouvent dans le certificat de contrôle ci-joint.

Il est possible d'effectuer un contrôle indépendant de la norme à l'aide de la solution standard (NaCl) prête à l'emploi livrée avec le kit. Un mélange de 0,5 mL de cette solution standard avec 0,5 mL de bactéries luminescentes resuspendues (selon démarche 2.1) donne une inhibition de la luminescence de 40 à 60 % après une incubation de 30 minutes à +15 °C.

Valeur du pH :

Selon la norme DIN EN ISO 11348-2, une correction du pH n'est pas nécessaire si le pH de l'échantillon est compris entre 6,0 et 8,5. Si le pH de l'échantillon se situe en dehors de l'échelle donnée, le pH devra être ramené à une valeur de 7,0 ± 0,2. Des valeurs de pH inférieures à 6,0 ou supérieures à 8,5 peuvent entraîner des inhibitions de la luminescence uniquement dues au pH.

Interférences :

Des particules de matière ou des matières non dissoutes, difficiles à dissoudre ou volatiles, qui réagissent avec l'eau de dissolution ou avec la suspension de test ou dont l'état se modifie pendant le test peuvent fausser le résultat ou entraver la consistance des résultats du test.

En présence d'échantillons fortement colorés ou troubles, des pertes de lumière peuvent avoir lieu par absorption ou dispersion de lumière. Ces nuisances peuvent être compensées au moyen de cuvettes de correction de couleur (REF 940006) selon la méthode décrite par la norme DIN EN ISO 11348-2, annexe A.

En présence d'échantillons à forte consommation d'oxygène, il se peut que l'oxygène nécessaire à la bioluminescence manque. Cela peut entraîner des inhibitions de luminescence n'ayant aucun rapport avec la toxicité.

Si l'échantillon d'eau est chargé organiquement de substances nutritives facilement biodégradables, il est alors possible qu'une perte d'intensité de la luminescence ait lieu sans qu'elle soit due à des déchets toxiques.

Des concentrations de NaCl dans l'échantillon inférieures à 15 g/L (1,5 %) ou supérieures à 50 g/L (5 %) ou à leur équivalent d'osmolarité entraînent des inhibitions de luminescence d'origine osmotique.

Élimination :

Les bactéries luminescentes et les préparations de test peuvent être éliminées dans l'évier sans aucun problème. Une exception devra être faite si l'échantillon contient des substances dangereuses pour la santé ou toxiques, donnant lieu à une élimination spécifique. D'après les directives et prescriptions en vigueur, l'utilisateur lui-même est tenu responsable de l'élimination selon les règles de ce type de préparations de test.

Littérature :

Norme DIN EN ISO 11348-2 : Détermination de l'effet inhibiteur des échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (Essai de bactéries luminescentes) ; Partie 2 : Méthode utilisant des bactéries déshydratées. Fiche technique pour l'assurance de qualité des analyses de l'eau, des eaux usagées et de la vase éditée par le groupe allemand de travail sur l'eau des Land (LAWA) P-9/5.

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienn Str. 11 · 52355 Düren · Allemagne
Tél. : +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · www.mn-net.com

France : MACHEREY-NAGEL SAS · 1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt · France
Tél. : 03 88 68 22 68 · sales-fr@mn-net.com

MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée) au capital de 186600 €
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 · N° intracommunautaire FR04 379 859 531

PD 14122 / A029186 / 945025 / xxxx

REF 945025

05.23

es

BioFix® Lumi Bacterias Luminosas, deshidratadas según DIN EN ISO 11348-2

Método:

La determinación de la toxicidad aguda para bacterias luminosas **deshidratadas** según DIN EN ISO 11348-2. La unidad de medida utilizada es la luminiscencia del microorganismo de *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Se evaluará la inhibición de la emisión de luz de la prueba, en comparación con la solución de control no inhibida. El grado de la inhibición indica la toxicidad de la prueba.

Área de aplicación:

Aguas residuales municipales e industriales, aguas superficiales, eluatos de suelos, basura y desechos industriales

Rango de análisis:

0–100 % de inhibición

Exhibición de los resultados:

- % de inhibición de la emisión de luz de la prueba respecto a la solución control no inhibida.
- **Valor G_L** (según DIN EN ISO 11348-2: **valor LID**): recíproco del primer factor de dilución de la prueba que presente una inhibición inferior al 20 %.
- **EC_{xx}**: Concentración de una prueba que presenta una inhibición de exactamente xx % (p. ej., el valor EC50: Concentración de la prueba que provoca la inhibición de la emisión de luz del 50 %).
- **Valores TU** („Toxicity units”, según definición de la Agencia de Protección del Medio Ambiente en los EEUU, U.S. EPA): 100 dividido por el valor EC50.

Contenido del kit de reactivos:

- 10 tubos conteniendo bacterias luminosas deshidratadas (DIN EN ISO 11348-2)
- 10 tubos conteniendo „BioFix® Lumi Solución Reactivante” (DIN EN ISO 11348-2), listos para el uso
- 1 tubo conteniendo solución estándar (NaCl), listo para el uso

Aviso de peligro:

Este kit no contiene ninguna sustancia peligrosa.

La estirpe bacteriana de *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 nunca se manifestó como agente patógeno. Según el informativo B006 1/92 ZH 1/346 de Berufsgenossenschaft der Chemischen Industrie (asociación profesional de la industria química en Alemania), *Vibrio fischeri* se clasifica en el grupo de riesgo I, es decir, no ofrece ningún riesgo para personas o vertebrados.

Almacenaje:

Se pueden almacenar los reactivos hasta la fecha de vencimiento impresa en el embalaje, a una temperatura de -20 ± 2 °C. Retire las bacterias luminosas del congelador solamente en el momento de la reactivación. Se deben consumir las bacterias reactivadas dentro de 4 horas. El almacenamiento intermedio de las bacterias luminosas, en el refrigerador (entre +2 °C y +8 °C), es posible sólo en el estado puro, no diluido.

Con el tiempo de almacenaje se puede disminuir la intensidad de la emisión de luz natural de las bacterias y alterar el rango de sensibilidad. La recongelación de bacterias ya reactivadas no es recomendable y no será cubierta por la garantía de la MACHEREY-NAGEL.

La reactivación y dosis de las BioFix® Lumi Bacterias Luminosas:

Independientemente de la prueba, la **reactivación** de las BioFix® Lumi Bacterias Luminosas Deshidratadas se realiza siempre de la misma forma. La **dosis** de las bacterias luminosas resuspendidas, a su vez, se cuantifica dependiendo del procedimiento sin (Fase de trabajo 2.1) o con (Fase de trabajo 2.2) la medición opcional del GL1.

Aviso importante:

Para mayores detalles respecto al procedimiento, consulte el manual del luminómetro utilizado.

Fase de trabajo 1: Reactivación
1. Retire la „BioFix® Lumi Solución Reactivante” del congelador, la descongele y ajuste la temperatura para +15 °C utilizando un bloque de calentamiento adecuado.
2. Retire un tubo conteniendo BioFix® Lumi Bacterias Luminosas Deshidratadas del congelador, inmediatamente antes de la reactivación, y agregue 1 mL „BioFix® Lumi Solución Reactivante”.
3. Descongele el tubo con las bacterias luminosas, reposarlo por 2 min. en un baño de maría (temperatura ambiente).
4. Luego, coloque el tubo con las bacterias resuspendidas en un bloque de calentamiento adecuado, por 15 min. , ajustando la temperatura para +15 °C .

Fase de trabajo 2.1: Dosis para el procedimiento <u>sin</u> la medición del GL1
1. Mezcle las bacterias resuspendidas con la „BioFix® Lumi Solución Reactivante” restante.
2. Vierta 0,5 mL de la suspensión de bacterias luminosas reactivadas en cada una de las cubetas con las pruebas.
3. Luego, ajuste la temperatura de las pruebas para +15 °C , durante 15 min.
4. Empezar la prueba midiendo la emisión de luz inicial I_0 .
Para mayores detalles respecto al procedimiento, consulte el manual del luminómetro utilizado.

o

Fase de trabajo 2.2: Dosis para el procedimiento <u>con</u> la medición del GL1
1. Agregue 2 mL de la „BioFix® Lumi Solución Reactivante” a las bacterias resuspendidas y agite bien.
2. Vierta 0,2 mL de esta suspensión en las cubetas (conteniendo prueba y control) destinadas a la determinación GL1 .
3. Mezcle las restantes bacterias luminosas resuspendidas con el resto de la „BioFix® Lumi Solución Reactivante”.
4. Vierta 0,5 mL de la suspensión de bacterias luminosas reactivadas en cada una de las demás cubetas con las pruebas.
5. Luego, ajuste la temperatura de las pruebas para +15 °C , durante 15 min.
6 Empezar la prueba midiendo la emisión de luz inicial I_0 .
Para mayores detalles respecto al procedimiento, consulte el manual del luminómetro utilizado.

Garantía de la calidad analítica:

Mediante la certificación anexada, la MACHEREY-NAGEL garantiza la atención a las exigencias de calidad conforme la norma industrial alemana DIN EN 11348-2.

Adicionalmente se pueden realizar pruebas de control por el usuario, utilizando las soluciones estándar determinadas en la norma, con la finalidad de verificar el funcionamiento correcto del sistema de análisis. Para mayores detalles e informaciones sobre soluciones estándar y concentraciones, vea la certificación anexada.

Para realizar pruebas **además de las previstas en la norma DIN EN ISO 11348-2**, se puede utilizar la solución estándar (NaCl) suministrada en el kit, lista para el uso. Agregando 0,5 mL de esta solución estándar a 0,5 mL de bacterias luminiscentes resuspendidas (tras el fase de trabajo 2.1) resultará, tras la incubación de 30 min, a una temperatura de +15 °C, la inhibición de la emisión de luz del 40 % al 60 %.

Valor pH:

Según DIN EN ISO 11348-2, un valor pH de 6,0 a 8,5 no exige corrección. Cuando conste un valor pH de la prueba inferior o superior de este rango, será necesario el ajuste hacia un valor pH de $7,0 \pm 0,2$. Valores pH inferiores de 6,0 o superiores de 8,5 pueden inhibir la emisión de luz, interfiriendo en el análisis.

Interferencias:

Sustancias y partículas no disueltas, mal disueltas o volátiles que reaccionan con agua o con la suspensión, o alteran su estado durante el análisis, pueden interferir en los resultados analíticos y en su reproducibilidad.

En pruebas fuertemente coloreadas o turbias, la absorción o difusión de la luz puede reducir la emisión de luz. Se puede compensar estas interferencias utilizando las cubetas para la corrección cromática (REF 940006), según el procedimiento descrito en la norma DIN EN ISO 11348-2, Apéndice A. En las pruebas que presentan un elevado consumo de oxígeno, puede faltar el oxígeno necesario para la bioluminiscencia. En este caso resultará la inhibición de la emisión de luz independiente de la toxicidad de la prueba.

Pruebas conteniendo sustancias nutrientes fácilmente degradables pueden presentar una reducción de la emisión de luz no causada por contaminantes.

Concentraciones de NaCl inferiores de 15 g/L (1,5%) y superiores de 50 g/L (5%), así como sus equivalentes de la osmolaridad, resultan en inhibiciones de la emisión de luz, de causa osmótica.

Eliminación:

Las bacterias luminosas y las pruebas utilizadas en el análisis se pueden desechar directamente en las aguas residuales domésticas. Pruebas conteniendo sustancias nocivas o tóxicas exigen el desecho diferenciado. Es de responsabilidad exclusiva del usuario del producto el desecho apropiado en conformidad con la respectiva legislación vigente.

Literatura:

DIN EN ISO 11348-2: Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test); Part 2: Method using liquid-dried bacteria
Informativo AQS para la garantía de la calidad en el análisis de aguas, aguas residuales y suelo (LAWA) P-9/5 (en alemán)

BioFix® Lumi Lichtgevende Bacteriën, vloeibaar gedroogd naar DIN EN ISO 11348-2

Methode:

Bepaling van de acute toxiciteit op vloeibaar gedroogde lichtgevende bacteriën naar DIN EN ISO 11348-2. Meetgrootte is het natuurlijke lichtvermogen (luminescentie) van het ingezette microorganisme *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Bepaald wordt de remming van de lichtintensiteit door de proef in vergelijking met een ongeremd controlebegin. De hoogte van de remming van de lichtintensiteit in de proef is een maat voor zijn toxiciteit.

Toepassing:

Communale en industrieel afvalwater, oppervlaktewater, waterige eluaten van bodems, afval en bodem- en grondwaterverontreinigingen.

Meetbereik:

0 – 100 % remming

Opgave van de resultaten:

- % remming van de lichtintensiteit in de proef in vergelijking met een ongeremde controle.
- **GL-waarde** (naar DIN EN ISO 11348-2: **LID-waarde**): Repricoke waarde van de eerste verdunningstrap van een proef, waarbij de remming van de lichtintensiteit minder dan 20 % bedraagt.
- **EC_{xx}**: Concentratie van een proef, die een remming van de lichtintensiteit van precies xx % veroorzaakt (bijv. EC50-waarde: Concentratie van de proef, die een remming van de lichtintensiteit van 50 % veroorzaakt).
- **TU-waarden** („Toxicity units” naar definitie van de Amerikaanse milieu-beschermingsinstantie U.S. EPA): 100 gedeeld door EC50-waarde.

Inhoud van reagensset:

10 reageerbuisjes met vloeibaar gedroogde lichtgevende bacteriën naar DIN EN ISO 11348-2
10 reageerbuisjes met „BioFix® Lumi Reactiveringoplossing” naar DIN EN ISO 11348-2, klaar in porties verdeeld
1 fles met gebruiksklare standaardoplossing (NaCl)

Gevarenaanzwijzingen:

Deze testkit bevat geen aanduidingsplichtige gevaarlijke stoffen.

De lichtgevende bacteriestam *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 is nog nooit als ziekteverwekker zichtbaar geworden. Naar het toelichtingsblad B006 1/92 ZH 1/346 van de ongevallenverzekering van de chemische industrie is *Vibrio fischeri* in de risicogroep 1 ingedeeld, d.w.z. er bestaat geen risico voor de mensen en voor gewervelde dieren.

Bewaring:

De testreagensen zijn bij -20 ± 2 °C tot en met de op de verpakking aangegeven vervaldatum houdbaar. De vloeibaar gedroogde lichtgevende bacteriën eerst onmiddellijk voor de reactivering uit het diepvrieskastje nemen en ontdooien. Gereactiveerde lichtgevende bacteriën moeten zo mogelijk binnen 4 uren worden opgebruikt! Een tijdelijke opslag van de gereactiveerde lichtgevende bacteriën mag slechts in onverdunde toestand (zie arbeidsstap 1) in de koelkast bij +2 °C bis +8 °C gebeuren. Met gevorderde bewaringstijd van de gereactiveerde lichtgevende bacteriën kan het tot een vermindering van de natuurlijke lichtintensiteit en tot een verschuiving van het gevoeligheidsspectrum komen. Een nieuw invriezen van de gereactiveerde lichtgevende bacteriën is niet aanbevelingswaardig en is de garantie van MACHEREY-NAGEL niet onderworpen.

Reactivering en dosering van de vloeibaar gedroogde BioFix® Lumi Lichtgevende Bacteriën:

De reactivering van vloeibaar gedroogde BioFix® Lumi Lichtgevende Bacteriën gebeurt onafhankelijk van de test altijd op dezelfde manier. De dosering van de geresuspendeerde lichtgevende bacteriën is van de facultatieve testuitvoering van de lichtgevende bacterietest naar DIN EN ISO 11348-2 zonder meting van GL1 (arbeidsstap 2.1) of met meting van GL1 (arbeidsstap 2.2) afhankelijk.

Belangrijke aanwijzing:

Details voor de verdere testuitvoering zijn uit de handleidingen en handboeken van de telkens gebruikte luminometer af te leiden!

Arbeidsstap 1: Reactivering
1. „BioFix® Lumi Reactiveringoplossing” uit het diepvrieskastje nemen, ontdooien en op +15 °C in een geschikte thermoblok op temperatuur brengen.
2. Een diepgevrozen reageerbuisje met BioFix® Lumi Lichtgevende Bacteriën onmiddellijk voor de reactivering uit het diepvrieskastje nemen en toevoeging van 1 mL „BioFix® Lumi Reactiveringoplossing” .
3. Lichtgevende bacteriën in een waterbad (binnentemperatuur) 2 min ontdooien en lossen .
4. Aansluitend het buisje met de geresuspendeerde lichtgevende bacteriën in een geschikte thermoblok 15 min bij +15 °C op temperatuur brengen.

Arbeidsstap 2.1: Dosering bij meting <u>zonder</u> GL1
1. De geresuspendeerde lichtgevende bacteriën met de resterende „BioFix® Lumi Reactiveringoplossing” mengen.
2. In iedere klaargezette testaanzetselcuvette 0,5 mL van de gereactiveerde lichtgevende bacteriesuspensie aanbrengen.
3. En 15 min bij +15 °C op temperatuur brengen.
4. Teststart door meting van het uitgangsschijven I₀ .
Details voor de verdere testuitvoering zijn uit de handleidingen en handboeken van de telkens gebruikte luminometer af te leiden!

of

Arbeidsstap 2.2: Dosering bij meting <u>met</u> GL1
1. Toevoeging van 2 mL „BioFix® Lumi Reactiveringoplossing” bij de geresuspendeerde lichtgevende bacteriën en goed mengen.
2. Telkens 0,2 mL van deze suspensie in de testaanzet-cuvetten voor een GL1-bepaling (controle en proegaanzet) aanbrengen.
3. De resterende geresuspendeerde lichtgevende bacteriën met de resterende „BioFix® Lumi Reactiveringoplossing” mengen.
4. In de resterende, klaargezette testaanzetsel-cuvetten telkens 0,5 mL van de gereactiveerde lichtgevende bacteriesuspensie aanbrengen.
5. En 15 min bij +15 °C op temperatuur brengen.
6. Teststart door meting van het uitgangsschijven I₀ .
Details voor de verdere testuitvoering zijn uit de handleidingen en handboeken van de telkens gebruikte luminometer af te leiden!

Analytische kwaliteitsgarantie:

In de DIN EN ISO 11348-2 wordt de nakoming van bepaalde geldigheidscriteria gevorderd. Met het bijgevoegde keuringscertificaat wordt door MACHEREY-NAGEL de nakoming van de gevorderde geldigheidscriteria gegarandeerd.

Voor een zelfcontrole en onderzoek van de correcte werkwijze van het testsysteem kan ook door de gebruiker zelf ter plaatse een controlemeting met de in de norm genoemde standaardoplossingen worden uitgevoerd. De hiervoor vereiste informatie zoals standaardsubstanties en testconcentraties zijn uit het bijgevoegde keuringscertificaat af te leiden.

Een van de norm onafhankelijke keuring kan met behulp van de bijgevoegde gebruiksklare standaardoplossing (NaCl) worden uitgevoerd. Een menging van 0,5 mL van deze standaardoplossing met 0,5 mL geresuspendeerde lichtgevende bacteriën (volgens arbeidsstap 2.1) heeft na 30 min. incubatie bij +15 °C een remming van de lichtintensiteit van 40 % tot 60 % als resultaat.

pH-waarde:

Volgens de DIN EN ISO 11348-2 is bij een pH-waarde van de proef van 6,0 tot 8,5 geen pH-correctie nodig. Ligt de pH-waarde van de proef buiten het genoemde bereik moet deze op een waarde van 7,0 ± 0,2 worden ingesteld. pH-waarden van minder dan 6,0 of groter dan 8,5 kunnen tot pH-afhankelijke lichtremmingen leiden.

Interferenties:

Niet opgeloste, zwaar oplosbare of vluchtige stoffen, die met het verdunningswater of de testsuspensie reageren of gedurende de test hun toestand veranderen, kunnen het testresultaat vervalsen of de reproduceerbaarheid van de testresultaten verminderen.

Bij sterk gekleurde of troebele proeven kunnen lichtverliezen door absorbering of lichtspreading voorkomen. Met behulp van kleurcorrectiecuvetten (REF 940006) kunnen deze storingen volgens de in de norm DIN EN ISO 11348-2, aanhangsel A beschreven procedure worden gecompenseerd. Bij sterk zuurstoferende proeven kan de voor de bioluminescentie noodzakelijke zuurstof (> 0,5 mg/L) ontbreken. Dit kan lichtremmingen veroorzaken, die niet toxiciteit zijn te wijten.

Bij organische belasting van de waterproef met biologisch licht afbreekbare voedingsstoffen kan een niet van schadelijke stoffen afhankelijk verlies van de lichtintensiteit optreden.

NaCl-concentraties in de proef van minder dan 15 g/L (1,5 %) of groter dan 50 g/L (5 %) resp. hun osmolariteitsequivalenten voeren tot osmotisch afhankelijke lichtremmingen.

Opruiming:

Lichtgevende bacteriën en testaanzetsels kunnen probleemloos over de gootsteen worden verwijderd. Beperkingen kunnen ontstaan, wanneer de proef gezondheidsgevaarlijke of giftige, speciaal verwijderingsplichtige substanties bevat. Voor de verwijdering volgens de voorschriften van zulke testaanzetsels is de gebruiker volgens de telkens daarvoor geldige richtlijnen en bepalingen zelf verantwoordelijk.

Literatuur:

DIN EN ISO 11348-2: Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test); Part 2: Method using liquid-dried bacteria
AQS-toelichtingsblad voor de kwaliteitsgarantie bij water-, afvalwater- en slikeronderzoeken van het samenwerkingsverband van de deelstaten Water (LAWA Duitsland) P-9/5