

REF 945002 / 945003

04.23

de

BioFix® Lumi Leuchtbakterien

nach DIN EN ISO 11348-3: 2009-05, DEV L53

Methode:

Bestimmung der akuten Toxizität auf **gefriergetrocknete** Leuchtbakterien nach DIN EN ISO 11348-3. 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:

Abwasser, wässrige Extrakte und Sickerwasser, Süßwasser (Oberflächenwasser und Grundwasser), Meerwasser und Brackwasser, Eluate von Sedimenten (Süßwasser, Brackwasser und Meerwasser), Porenwasser, Einzelstoffe in Wasser gelöst.

Messbereich:

0 – 100 % Hemmung

Angabe der Ergebnisse:

- % **Hemmung** der Leuchtintensität in der Probe im Vergleich zu einer ungehemmten Kontrolle
- **Gib-Wert** (nach DIN EN ISO 11348-3/ Anhang B): Kehrwert der ersten Verdünnungsstufe einer Probe, bei der die Hemmung der Leuchtintensität weniger als 20 % beträgt.
- **ECxx**: 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:	REF 945002
ausreichend für	2000 Bestimmungen 20 Röhrchen mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien nach DIN EN ISO 11348-3 1 Flasche mit 25 mL „BioFix® Lumi Rekonstitutionslösung“
	REF 945003
ausreichend für	1000 Bestimmungen 10 Röhrchen mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien nach DIN EN ISO 11348-3 1 Flasche mit 15 mL „BioFix® Lumi Rekonstitutionslösung“

Gefahrenhinweise:

Dieser 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.

Benötigtes Zubehör:

„BioFix® Lumi Medium für gefriergetrocknete Leuchtbakterien“ (REF 945608), Glasküvetten 50 x 12 mm (REF 916912)

Lagerung:

Die Röhrchen mit den gefriergetrockneten BioFix® Lumi Leuchtbakterien sind bei -15 °C bis -21 °C bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum haltbar. Die „BioFix® Lumi Rekonstitutionslösung“ kann aufgetaut im Kühlschrank bei +2 °C bis +8 °C bis zum aufgedruckten Haltbarkeitsdatum gelagert werden.
Die gefriergetrockneten Leuchtbakterien erst unmittelbar vor der Reaktivierung dem Gefrierfach entnehmen. Reaktivierte Leuchtbakterien sollten möglichst innerhalb von 4 Stunden aufgebraucht werden! Eine Zwischenlagerung der reaktivierten Leuchtbakterien darf **nur im verdünnten Zustand (siehe Arbeitsschritt 2/Variante B)** 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 reaktivierter Leuchtbakterien ist nicht zu empfehlen und unterliegt nicht den Garantieleistungen von MACHERY-NAGEL.

Reaktivierung und Dosierung der gefriergetrockneten BioFix® Lumi Leuchtbakterien:

Die Reaktivierung und Dosierung (wahlweise Variante A oder Variante B) gefriergetrockneter BioFix® Lumi Leuchtbakterien erfolgt testunabhängig immer auf die gleiche Art und Weise.

Wichtiger Hinweis:

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

Arbeitsschritt 1: Reaktivierung
1. Ein tiefgefrorenes Röhrchen mit BioFix® Lumi Leuchtbakterien dem Tiefkühlfach und die vorgekühlte Flasche mit „BioFix® Lumi Rekonstitutionslösung“ dem Kühlschrank entnehmen.
2. So schnell wie möglich 1 mL auf +2 °C bis +8 °C vorgekühlte „BioFix® Lumi Rekonstitutionslösung“ auf die BioFix® Lumi Leuchtbakterien gießen („Schockauftauen“).
3. Leuchtbakterien durch mehrmaliges Schütteln des Röhrchens lösen.
4. Reaktivierte Leuchtbakterien in geeignete Glasküvette (50 x 12 mm, REF 916912) überführen und vor weiterer Verarbeitung zur Stabilisierung 5 min bei +2 °C bis +8 °C zwischenlagern (z.B. im Leuchtbakterien-Vorratsschacht des Luminometers Microtox® Modell 500).

Arbeitsschritt 2: Dosierung

Variante A:

1. In jede bereitgestellte Testansatz-Küvette werden 0,5 mL vorgekühltes „BioFix® Lumi Medium für gefriergetrocknete Leuchtbakterien“ (REF 945608) vorgelegt.
2. Anschließend Zugabe von jeweils **10 µL reaktivierter, unverdünnter Leuchtbakteriensuspension**.
3. Für **15 min** bei +15 °C temperieren.
4. Teststart durch **Messung des Ausgangsleuchtens I₀**.

Wichtig! Nach Messen des Ausgangsleuchtens und vor Zugabe der Kontroll- bzw. Probelösung die Küvetten während der Inkubationszeit bei +15 °C temperieren.
Details zur weiteren Testdurchführung sind den Anleitungen und Handbüchern der jeweils verwendeten Luminometer zu entnehmen.

Variante B:

1. In einem Becherglas geeigneter Größe mischt man im **Verhältnis 1 + 50 reaktivierte, unverdünnte Leuchtbakteriensuspension** mit auf +2 °C bis +8 °C vorgekühltem „BioFix® Lumi Medium für gefriergetrocknete Leuchtbakterien“ (REF 945608) (z. B. 0,5 mL reaktivierte Leuchtbakterien + 25 mL Medium).
2. Vorlegen von jeweils **0,5 mL** dieser verdünnten, reaktivierten Leuchtbakteriensuspension in jede bereitgestellte Testansatz-Küvette.
3. Für **15 min** bei +15 °C temperieren.
4. Teststart durch **Messung des Ausgangsleuchtens I₀**.

Wichtig! Nach Messen des Ausgangsleuchtens und vor Zugabe der Kontroll- bzw. Probelösung die Küvetten während der Inkubationszeit bei +15 °C temperieren.
Details zur weiteren Testdurchführung sind den Anleitungen und Handbüchern der jeweils verwendeten Luminometer zu entnehmen.

Analytische Qualitätssicherung:

In der DIN EN ISO 11348-3 wird die Einhaltung bestimmter Gültigkeitskriterien gefordert. Mit dem beigefügten Prüzfertifikat wird von MACHERY-NAGEL die Einhaltung der geforderten Gültigkeitskriterien garantiert.

Die Empfindlichkeit der gelieferten Leuchtbakterien ist gemäß Norm auch im eigenen Labor zu überprüfen. Die hierzu notwendigen Informationen wie Standardsubstanzen und Testkonzentrationen sind dem beiliegenden Prüzfertifikat zu entnehmen.

pH-Wert:

Gemäß der DIN EN ISO 11348-3 ist bei einem pH-Wert der Probe von 6,0 bis 8,5 keine pH-Korrektur notwendig. pH-Werte von kleiner 6,0 oder größer 8,5 können zu pH-bedingten Leuchthemmungen führen. Soll der etwaige toxische Effekt des pH-Wertes unberücksichtigt bleiben, so muss dieser eingestellt werden.

Störungen:

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

Bei stark gefärbten (insbesondere rot oder braun gefärbt) oder trüben Proben können Lichtverluste durch Absorption oder Lichtstreuung eintreten. Diese Störungen können durch eine Probenvorbereitung (Absetzen oder Zentrifugieren) oder z. B. durch Verwendung von Farbkorrektur-Küvetten mit Doppelwänden (REF 940006) in Anlehnung an das Verfahren nach DIN EN ISO 11348, Anhang A kompensiert werden.

Da Sauerstoff für die Biolumineszenz benötigt wird (> 3 mg/L), kann bei stark sauerstoffzehrenden Proben oder Proben mit einem geringen Sauerstoffgehalt ein Sauerstoffmangel auftreten, der zu einer Hemmung der Lichtemission führen kann. Enthält die Wasserprobe biologisch leicht abbaubare Nährstoffe, kann eine nicht durch Schadstoffe bedingte Abnahme der Biolumineszenz eintreten.

Das es sich bei dem Testorganismus *Vibrio fischeri* um ein marines Bakterium handelt, führt die Untersuchung von meereswasserhaltigen Proben häufig zu einer Erhöhung der Biolumineszenz, wodurch Hemmwirkungen maskiert werden können (DIN EN ISO 11348-Anhang D).

Salzkonzentrationen in der Wasserprobe über 30 g/L NaCl oder Stoffkonzentrationen anderer Substanzen gleicher Osmolarität können zusammen mit der im Test geforderten Salzaufstockung zu hyperosmotischen Effekten führen. Zur Vermeidung dieser Wirkungen sollte die resultierende Salzkonzentration die Osmolarität einer Natriumchlorid-Lösung von 35 g/L NaCl nicht überschreiten.

Auch chlorhaltige Proben stören die Testdurchführung und müssen vor Testbeginn dechloriert werden, z. B. durch Zugabe von 1 %iger Natriumthiosulfat-Lösung.

Entsorgung:

Leuchtbakterien und Testansätze können problemlos über den Abguss entsorgt werden. Einschränkungen können entstehen, wenn die Probe gesundheitsgefährdend 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 11348-3:2009-05

Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest); Teil 3: Verfahren mit gefriergetrockneten Bakterien

MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Deutschland

Tel.: +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · www.mn-net.com

Schweiz: MACHERY-NAGEL AG · Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Schweiz

Tel.: 062 388 55 00 · sales-ch@mn-net.com

BioFix® Lumi Luminescent Bacteria

in accordance with DIN EN ISO 11348-3: 2009-05, DEV L53

Method:

Determination of the acute toxicity on **freeze-dried** luminescent bacteria in accordance with DIN EN ISO 11348-3. The measuring unit is the natural luminescence of the used microorganism *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. The test system measures the light output of the luminescent bacteria after they have been challenged by a sample and compares it to the light output of a control (reagent blank) that contains no sample. A difference in light output between the sample and the control is attributed to the effect of the sample on the organisms.

Field of application:

Waste water, aqueous extracts and leachates, fresh water (surface water and ground water), seawater, brackish water, eluates of sediments (fresh water brackish water and seawater), interstitial pore water, and single substances dissolved in water.

Measuring range:

0 – 100% inhibition

Indication of the results:

- % **Inhibition** of the light output in the sample in comparison to an uninhibited control
- **G_{ib}-value** in accordance with DIN EN ISO 11348-3, annex B) : reciprocal value of the first dilution of a sample for which the inhibition of the light output amounts to less than 20 %.
- **EC₅₀**: concentration of a sample which causes an inhibition of the light output of exactly xx % (e.g. EC50 value: concentration of the sample which causes an inhibition of the light output of 50 %):
- **TU-values** "Toxicity units" in accordance with the definition of the United States Environmental Protection Agency U.S. EPA): 100 divided by the EC50 value.

Contents:	REF 945002
sufficient for	2000 determinations 20 vials with freeze-dried luminescent bacteria in accordance with DIN EN ISO 11348-3 1 flask with 25 mL „BioFix® Lumi Reconstitution solution“
	REF 945003
sufficient for	1000 determinations 10 vials with freeze-dried luminescent bacteria in accordance with DIN EN ISO 11348-3 1 flask with 15 mL „BioFix® Lumi Reconstitution solution“

Safety precautions:

This test kit does not contain any hazardous substances for which labelling is obligatory. The luminescent microorganism *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 has never appeared as a pathogen up to now. In accordance with the code of practice B006 1/92 ZH 1/346 of the employer's liability insurance association of the chemical industry *Vibrio fischeri* is assigned to the risk group 1 i.e. there is no risk for humans and vertebrates.

Required accessories:

BioFix® Lumi Medium for freeze-dried luminescent bacteria" (REF 945608), glass cuvettes 50 × 12 mm (REF 916912)

Storage:

The vials with freeze-dried BioFix® Lumi luminescent bacteria can be stored until the expiration date indicated on the packaging at temperatures of -15 to -21 °C. The "BioFix® Lumi Reconstitution solution" can be stored in an unfrozen state in the refrigerator at temperatures of between +2 °C and +8 °C until the expiration date (see label).

The freeze-dried luminescent bacteria should only be removed from the freezer compartment immediately prior to their reactivation. Reactivated luminescent bacteria should be used within 4 hours! An intermediate storage of the reactivated luminescent bacteria in the refrigerator at temperatures between +2 °C and +8 °C is only acceptable **after dilution (see Step 2 of Procedure B)**. Upon storage of the reactivated luminescent bacteria a reduction of the natural light emission and a shift of the sensitivity spectrum can be possible. It is not recommended to refreeze the reactivated luminescent bacteria and is not subject to the guarantee obligations of MACHEREY-NAGEL.

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

The reactivation and dosage (procedure A or procedure B) of freeze-dried BioFix® Lumi luminescent bacteria is always carried out in the same way irrespective of the type of test

Important Note:

Further details to the test procedures can be derived from the instructions for use of the corresponding tests, test systems and handbooks of the luminometers used.

Step 1: Reactivation

1. Remove a deep frozen vial with BioFix® Lumi luminescent bacteria from the deep-freeze compartment and the precooled flask with „BioFix® Lumi Reconstitution solution“ from the refrigerator.
2. As quickly as possible **pour 1 mL** precooled (+2 °C to +8 °C) „BioFix® Lumi Reconstitution solution“ to the BioFix® Lumi luminescent bacteria („shock thawing“).
3. Dissolve the luminescent bacteria by shaking the vial several times.
4. Fill the solution of reactivated luminescent bacteria in an appropriate glass cuvette (50 × 12 mm, REF 916912) and prior to further use store the solution for an interim period for 5 minutes at a temperature of +2 °C to +8 °C to stabilise it (e. g., in the Reagent well of the luminometer Microtox® Modell 500).

Step 2: Dosage

- Procedure A:**
1. Transfer 0.5 mL of precooled „BioFix® Lumi Medium for freeze-dried luminescent bacteria“ (REF 945608) to each provided cuvette.
 2. After that add **10 µL reactivated, undiluted luminescent bacteria suspension** to each cuvette.
 3. Incubate for **15 min** at +15 °C.
 4. Start the test by **measuring the initial luminescence I₀**.

Important! After the measurement of the initial luminescence and prior to the addition of the control or sample solution it is important to keep the cuvettes at +15 °C.

Further details to the test procedure can be derived from the respective instructions for use of the luminometers used.

- Procedure B:**
1. Mix in a beaker of appropriate size **reactivated, undiluted luminescent bacteria suspension** and precooled (+2 °C to +8 °C) „BioFix® Lumi Medium for freeze-dried luminescent bacteria“ (REF 945 608) with a **ratio of 1 + 50** (e. g., 0.5 mL reactivated luminescent bacteria plus 25 mL medium)
 2. Transfer **0,5 mL** of this **diluted, reactivated luminescent bacteria suspension** to each provided cuvette.
 3. Incubate for **15 min** at +15 °C temperieren.
 4. Start the test by **measuring the initial luminescence I₀**.

Important! After the measurement of the initial luminescence and prior to the addition of the control or sample solution it is important to keep the cuvettes at +15 °C.

Further details to the test procedure can be derived from the respective instructions for use of the luminometers used.

Analytical quality assurance:

The compliance of certain validity criteria is required by DIN EN ISO 11348-3. The compliance is guaranteed by MACHEREY NAGEL by means of the enclosed test certificate.

According to the above mentioned norm the sensitivity of the luminescent bacteria has to be controlled by the end user. The required information such as reference substances of concentrations can be derived from the enclosed test certificate

pH-value:

According to the DIN EN ISO 11348-3 no correction of the pH is required if the pH value of the sample is between 6.0 and 8.5. It may be noted that pH-values of less than 6.0 and greater than 8.5 can lead to pH-related inhibitions of luminescence.

Interferences:

Non or hardly soluble or volatile substances or compounds which are difficult to dissolve, or substances which react with the diluent or the test suspension or which change their state during the test can falsify the test result or make it difficult to reproduce the test results.

Strong coloured or turbid samples can cause losses of light due to light adsorption or scattering. In accordance with the procedure described in DIN EN ISO 11348-3, annex A, these effects can be minimized by an appropriate sample treatment (centrifugation or sedimentation) or by using colour correction cuvettes (REF 940006).

Oxygen is required for the bioluminescence (> 3 mg/L) and can be limiting in case of samples with a strong oxygen consumption. This can finally result in an inhibition of light emission.

If the water sample contains easily biodegradable nutrients a loss of the light intensity which is not caused by contaminants can occur.

As the test organism *Vibrio fischeri* is a marine organism the use of seawater samples can lead to an increase of luminescence masking potential inhibitory effects of the sample (see DIN EN ISO 11348 annex D).

Salt concentrations of the sample higher than 30 g/L NaCl or concentrations of other compounds with similar osmolality can in conjunction with the salts in the test solutions lead to hyperosmotic effects. To prevent these effects the overall salt concentration should not exceed the osmolality corresponding to 35 g/L NaCl.

Chlorine containing samples effect the test procedure so that a dechlorination is mandatory, e.g., by addition of a 1 % sodium thiosulfate solution.

Disposal:

Luminescent bacteria and test preparations can be disposed of without difficulty via the sink. Restrictions can arise if the sample contains hazardous or toxic substances which are subject to waste disposal regulations. The user him/herself is responsible for the orderly disposal of such test preparations in accordance with the respectively valid guidelines and regulations.

Literature:

DIN EN ISO 11348-3:2009-05

Determination of the inhibitory effect of water samples upon the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test); part 3; procedure with freeze-dried bacteria.

REF 945002 / 945003

04.23

fr

BioFix® Lumi Bactéries lumineuses

selon DIN EN ISO 11348-3: 2009-05, DEV L53

Méthode :

Détermination de la toxicité aiguë par le biais de bactéries lumineuses **lyophilisées** selon DIN EN ISO 11348-3. La grandeur mesurée est la bioluminescence ou luminescence naturelle du microorganisme *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 utilisé pour l'essai. La détermination porte sur l'inhibition de la luminescence de l'échantillon comparée à la luminescence d'un témoin non inhibé. Le pourcentage d'inhibition de la luminescence des bactéries dans l'échantillon est révélateur de la toxicité de celui-ci.

Domaine d'application :

Eaux usées, extraits aqueux et lixiviats, eaux douces (eaux de surface et souterraines), eau de mer et eaux saumâtres, éluats de sédiments (eau douce, eau saumâtre et eau de mer), eaux interstitielles, substances individuelles diluées dans l'eau.

Domaine de mesure :

0 – 100 % d'inhibition

Paramètres déterminables :

- **Pourcentage d'inhibition** de la luminescence dans l'échantillon par rapport à un témoin non inhibé
- **Valeur de la toxicité indiquée par les bactéries lumineuses** (valeur G_{10} selon DIN EN ISO 11348-3/Annexe B) : valeur inverse du premier niveau de dilution d'un échantillon dont l'inhibition de la luminescence est de moins de 20 %.
- **EC_{xx}** : concentration d'un échantillon entraînant une inhibition de la lumière produite de xx % exactement (valeur CE50 par ex. : concentration de l'échantillon entraînant une inhibition de 50 % de la luminescence).
- **Valeurs en unités toxiques** (« Toxicity units ou TU » selon la définition de l'Administration Américaine de l'Environnement U.S. EPA) : 100 divisé par la valeur CE₅₀.

Contenu :	REF 945002
suffit pour	2000 déterminations 20 flacons contenant des bactéries lumineuses lyophilisées selon DIN EN ISO 11348-3 1 flacon de 25 mL de solution de reconstitution „BioFix® Lumi
	REF 945003
suffit pour	1000 déterminations 10 flacons contenant des bactéries lumineuses lyophilisées selon DIN EN ISO 11348-3 1 flacon de 15 mL de solution de reconstitution „BioFix® Lumi

Indications de danger :

Ce kit de test ne contient aucune matière dangereuse soumise à l'étiquetage obligatoire.
La souche bactérienne *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 ne s'est encore jamais manifestée sous forme d'agent pathogène. Selon la fiche de données B006 1/92 ZH 1/346 délivrée par l'Association Professionnelle de l'Industrie Chimique, *Vibrio fischeri* appartient au groupe de risques 1 et ne présente donc aucun risque pour l'homme et les vertébrés.

Accessoire nécessaire :

Milieu d'incubation pour bactéries lumineuses lyophilisées BioFix® Lumi (REF 945608), cuves en verre de 50 x 12 mm (REF 916912)

Conservation et stabilité :

Les flacons contenant les bactéries lumineuses lyophilisées BioFix® Lumi se conservent jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage à une température entre -15 et -21 °C. La solution de reconstitution BioFix® Lumi décongelée peut être stockée dans le réfrigérateur à une température entre +2 et +8 °C jusqu'à la date limite d'utilisation imprimée. Sortir les bactéries lumineuses lyophilisées du compartiment congélateur seulement juste avant la réactivation. Une fois réactivées, les bactéries lumineuses doivent si possible être utilisées en l'espace de 4 heures ! Un stockage intermédiaire des bactéries lumineuses réactivées est **uniquement autorisé à l'état dilué (voir Étape 2/Variante B)** et dans le réfrigérateur, à une température entre +2 et +8 °C. Toute prolongation du temps de conservation des bactéries lumineuses réactivées peut engendrer une décroissance de la luminescence naturelle ainsi qu'un décalage du spectre de sensibilité. La recongélation des bactéries lumineuses réactivées n'est pas recommandée et elle n'est pas couverte par la garantie de MACHEREY-NAGEL.

Réactivation et dosage des bactéries lumineuses lyophilisées BioFix® Lumi :

Indépendamment de l'essai effectué, la réactivation et le dosage (au choix variante A ou variante B) des bactéries lumineuses lyophilisées BioFix® Lumi s'effectuent toujours selon la même méthode.

Remarque importante :

Pour en savoir davantage sur la suite de l'essai, veuillez consulter les instructions spécifiques aux tests et systèmes analytiques correspondants ainsi que les guides d'utilisation des luminomètres respectivement utilisés !

Étape 1 : Réactivation

- Sortir un flacon congelé contenant des bactéries lumineuses BioFix® Lumi du compartiment congélateur ainsi que le flacon prérefroidi contenant la solution de reconstitution BioFix® Lumi du réfrigérateur.
- Verser** le plus rapidement possible **1 mL de solution de reconstitution BioFix® Lumi** prérefroidie à une température entre +2 et +8 °C sur les bactéries lumineuses BioFix® Lumi (décongélation ultra-rapide).
- Dissoudre les bactéries lumineuses en agitant plusieurs fois le flacon.
- Transférer les bactéries lumineuses réactivées dans une cuve en verre appropriée (50 x 12 mm, REF 916912), avant de les utiliser, les entreposer pendant 5 min à une température entre +2 et +8 °C à des fins de stabilisation (par ex. dans le compartiment pour bactéries lumineuses du luminomètre Microtox® 500).

Étape 2 : Dosage

Variante A :

- Verser 0,5 mL de milieu d'incubation pour bactéries lumineuses lyophilisées BioFix® Lumi (REF 945608) prérefroidi dans chacune des cuves.
- Ajouter ensuite respectivement **10 µL de suspension réactivée, non diluée, de bactéries lumineuses.**
- Tempérer à **+15 °C pendant 15 min.**
- Lancer l'essai par la **mesure de la luminescence initiale I₀**.
Important ! Après avoir mesuré la luminescence initiale et avant d'ajouter la solution témoin ou la solution échantillon, tempérer les cuves à **+15 °C pendant le temps d'incubation.**
Pour en savoir davantage sur la suite de l'essai, veuillez consulter les instructions correspondantes et les guides d'utilisation des luminomètres respectivement utilisés !

Variante B :

- Utiliser un béccher de taille appropriée pour mélanger dans un **rapport de 1 + 50** une **suspension de bactéries lumineuses réactivées, non diluées** avec le milieu d'incubation pour bactéries lumineuses BioFix® Lumi prérefroidi à une température entre +2 et +8 °C (REF 945608) (par ex. 0,5 mL de bactéries lumineuses réactivées + 25 mL de milieu d'incubation).
- Verser respectivement **0,5 mL de cette suspension de bactéries lumineuses réactivées, diluée,** dans chacune des cuves.
- Tempérer à **+15 °C pendant 15 min.**
- Lancer l'essai par la **mesure de la luminescence initiale I₀**.
Important ! Après avoir mesuré la luminescence initiale et avant d'ajouter la solution témoin ou la solution échantillon, tempérer les cuves à **+15 °C pendant le temps d'incubation.**
Pour en savoir davantage sur la suite de l'essai, veuillez consulter les instructions correspondantes et les guides d'utilisation des luminomètres respectivement utilisés !

Assurance qualité analytique :

La norme DIN EN ISO 11348-3 exige le respect de certains critères de validité. Avec le certificat de contrôle ci-joint, MACHEREY-NAGEL garantit le respect des critères de validité revendiqués.

La sensibilité des bactéries lumineuses livrées doit également être vérifiée par l'opérateur dans son propre laboratoire, conformément à la norme en vigueur. Les informations requises à cet effet telles que les substances standard et les concentrations des tests figurent dans le certificat de contrôle ci-joint.

PH :

Conformément à l'énoncé de la norme DIN EN ISO 11348-3, il n'est pas nécessaire de corriger le pH si l'échantillon a un pH de 6,0 à 8,5. Des pH inférieurs à 6,0 ou supérieurs à 8,5 peuvent occasionner des inhibitions de la luminescence. Pour que l'éventuel effet toxique dû aux écarts de pH reste négligeable, il est nécessaire d'ajuster le pH.

Interférences :

Les composants ou matières non dissoutes, difficilement solubles ou volatiles réagissant avec l'eau de dilution ou la suspension de test ou modifiant leur état pendant l'essai peuvent fausser les résultats obtenus ou nuire à la reproductibilité de ces derniers.

Des pertes de luminescence peuvent se produire par absorption ou diffusion de lumière en cas d'échantillons très colorés (tout particulièrement pour les colorations rouges ou marron) ou troubles. Ces interférences peuvent être compensées par une préparation de l'échantillon (sédimentation ou centrifugage) ou par ex. par utilisation de cuves de correction chromatique à double paroi (REF 940006) en référence à la méthode selon la norme DIN EN ISO 11348, annexe A.

Comme la bioluminescence requiert de l'oxygène (> 3 mg/L), il se peut que dans le cas d'échantillons consommant beaucoup d'oxygène ou à faible teneur en oxygène, il se produise un manque d'oxygène susceptible d'occasionner une inhibition de l'émission lumineuse.

Si l'échantillon d'eau contient des nutriments facilement biodégradables, il peut se produire une baisse de la bioluminescence non imputable aux polluants.

L'organisme *Vibrio fischeri* utilisé pour l'essai étant une bactérie marine, l'analyse d'échantillons contenant de l'eau de mer occasionne fréquemment une élévation de la bioluminescence ce qui entraîne le masquage d'effets inhibiteurs (DIN EN ISO 11348, annexe D).

Conjointement à l'ajout de sel exigé dans le test, des concentrations dans l'échantillon d'eau de plus de 30 g/L NaCl ou des concentrations d'autres substances de même osmolarité peuvent entraîner des effets hyperosmotiques. Pour éviter ces effets, la concentration de sel résultante ne devrait pas dépasser l'osmolarité d'une solution de chlorure de sodium d'une concentration de 35 g/L de NaCl.

Les échantillons contenant du chlore perturbent aussi la réalisation de l'essai et doivent être déchlorés avant de commencer l'essai, par ex. par ajout d'une solution de thiosulfate de sodium à 1 %.

Élimination des déchets :

Les bactéries lumineuses et les charges d'essai peuvent sans problème être éliminées dans l'évier. Il peut y avoir certaines restrictions si l'échantillon contient des substances toxiques ou qui présentent un danger pour la santé et sont soumises à l'obligation d'être éliminées de manière appropriée. Pour l'élimination de telles charges d'essai, l'utilisateur est responsable de leur élimination en bonne et due forme, conformément aux directives et règlements en vigueur.

Littérature :

DIN EN ISO 11348-3 : 2009-05

Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (essai de bactéries lumineuses) – partie 3 : méthode utilisant des bactéries lyophilisées.

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 Hoerd · 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

REF 945002 / 945003

04.23

es

BioFix® Lumi Bacterias luminiscentes

según DIN EN ISO 11348-3: 2009-05, DEV L53

Método:

Determinación de la toxicidad aguda mediante bacterias luminiscentes **liofilizadas** según DIN EN ISO 11348-3. El parámetro medido es la luminiscencia natural (bioluminiscencia) del microorganismo empleado para la determinación: la bacteria *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. En este test, lo que se mide es la inhibición de la bioluminiscencia de la bacteria después de haber sido mezclada con la muestra, y se compara con una solución de control sin muestra (blanco). El porcentaje de inhibición de la luminiscencia en la muestra nos indica su grado de toxicidad.

Áreas de aplicación:

Aguas residuales, extractos acuosos y lixiviados, agua dulce (aguas superficiales y aguas subterráneas), agua de mar y agua salobre, eluatos de sedimentos (agua dulce, agua salobre y agua de mar), agua intersticial, así como sustancias individuales diluidas en agua.

Rango de medida:

0 – 100% inhibición

Parámetros determinables con este test:

- **Porcentaje de inhibición:** inhibición de la luminiscencia de la muestra después de compararla con una solución de control (blanco).
- **Valor de la toxicidad indicada por las bacterias luminiscentes (valor G_{ib} según DIN EN ISO 11348-3/Anexo B):** valor recíproco o inverso de la primera dilución de la muestra en la que la inhibición de la luminiscencia es inferior al 20%.
- **Concentración efectiva (EC_{xx}):** concentración de la muestra que causa una inhibición de la luminiscencia de X%. Por ejemplo, EC_{50} nos indica la concentración de la muestra que causa una inhibición de la luminiscencia del 50%.
- **Unidades de toxicidad (TU):** según la EPA, se calculan con la expresión $100/\text{valor } CE_{50}$.

Contenido:	REF 945002
máximo para	2000 determinaciones
	20 viales con bacterias luminiscentes liofilizadas, según DIN EN ISO 11348-3
	1 frasco de 25 mL con solución reconstituyente BioFix® Lumi
	REF 945003
máximo para	1000 determinaciones
	10 viales con bacterias luminiscentes liofilizadas, según DIN EN ISO 11348-3
	1 frasco de 15 mL con solución reconstituyente BioFix® Lumi

Indicaciones de peligro:

Este test no contiene ninguna sustancia peligrosa que deba ser indicada en la etiqueta.

La cepa de bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 nunca se ha manifestado como agente patógeno. En su hoja informativa B006 1/92 ZH 1/346, la Asociación Profesional de la Industria Química alemana ha clasificado a la bacteria *Vibrio fischeri* dentro del grupo de riesgo 1, es decir, como **NO** peligrosa para las personas y animales vertebrados.

Accesorios requeridos:

Medio de incubación BioFix® Lumi para bacterias luminiscentes liofilizadas (REF 945608), cubetas de vidrio de 50 x 12 mm (REF 916912)

Almacenamiento:

Los viales con las bacterias luminiscentes BioFix® Lumi liofilizadas deben mantenerse a una temperatura de -15 a -21 °C; de esta manera podrán usarse hasta la fecha de vencimiento que consta en el envase. La solución reconstituyente BioFix® Lumi no necesita estar congelada, sino que puede guardarse a una temperatura de 2 a 8 °C hasta la fecha de vencimiento.

Las bacterias luminiscentes sólo deberán sacarse del congelador justo antes de su reactivación. Una vez reactivadas, procurar usar las bacterias en un intervalo de tiempo no mayor de 4 horas. Las bacterias reactivadas **sólo podrán guardarse de nuevo** en la nevera a una temperatura entre 2 y 8 °C **si han sido diluidas (ver paso 2/variante B)**. Mientras más tiempo se guarden las bacterias reactivadas, mayor es la posibilidad de que se produzca una disminución de su bioluminiscencia, así como una alteración del espectro de sensibilidad. El volver a congelar las bacterias reactivadas no se recomienda y constituye un uso incorrecto del producto; en este caso, MACHEREY-NAGEL quedará eximida de toda obligación de prestación de garantía.

Reactivación y dosificación de las bacterias luminiscentes BioFix® Lumi:

La reactivación y la dosificación de las bacterias luminiscentes liofilizadas BioFix® Lumi se realizan siempre de la misma manera, independientemente del tipo de ensayo.

Nota importante:

Para mayor información acerca de la forma de realizar cada ensayo, véanse las instrucciones de uso de los tests y sistemas analíticos respectivos, así como los manuales de los luminómetros empleados.

Paso 1: Reactivación

1. Sacar del congelador un vial con bacterias luminiscentes BioFix® Lumi y de la nevera el frasco de solución reconstituyente BioFix® Lumi.
2. **Añadir lo más rápidamente posible 1 mL de la solución reconstituyente BioFix® Lumi** refrigerada (2–8 °C) a las bacterias luminiscentes **BioFix® Lumi** congeladas (choque térmico).
3. Agitar varias veces el vial hasta que se disuelvan las bacterias.
4. Trasvasar las bacterias luminiscentes reactivadas a una cubeta de vidrio adecuada (50 x 12 mm, REF 916912) y, antes de trabajar con ellas, guardarlas por 5 min a una temperatura entre +2 °C y +8 °C para su estabilización (p. ej. en el compartimento para bacterias del luminómetro Microtox® 500).

Paso 2: Dosificación

Variante A:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verter en cada cubeta que se vaya a usar para el test 0,5 mL del medio de incubación para bacterias luminiscentes liofilizadas BioFix® Lumi (REF 945608). 2. Seguidamente agregar a cada cubeta 10 µL de suspensión no diluida de bacterias luminiscentes reactivadas. 3. Incubar por 15 min a +15 °C. 4. Comenzar con el ensayo midiendo la luminiscencia inicial I_0. Atención: Después de haber medido la luminiscencia inicial, deben incubarse las cubetas a +15 °C antes de agregar la solución de control o la solución con la muestra. Para mayor información acerca de la forma de realizar el ensayo, véanse las instrucciones de uso de los tests respectivos respectivos, así como de los luminómetros empleados.
Variante B:	<ol style="list-style-type: none"> 1. En un vaso de precipitados de tamaño adecuado, mezclar la suspensión no diluida de bacterias luminiscentes reactivadas con el medio de incubación para bacterias liofilizadas BioFix® Lumi (REF 945608) previamente refrigerado entre 2 y 8 °C en una proporción de 1 + 50 (p. ej. 0,5 mL suspensión de bacterias reactivadas + 25 mL medio de incubación). 2. Transferir a cada cubeta que vaya a usar para el ensayo 0,5 mL de la suspensión diluida de bacterias luminiscentes reactivadas. 3. Incubar por 15 min a +15 °C. 4. Comenzar con el ensayo midiendo la luminiscencia inicial I_0. Atención: Después de haber medido la luminiscencia inicial, deben incubarse las cubetas a +15 °C antes de agregar la solución de control o la solución con la muestra. Para mayor información acerca de la forma de realizar el ensayo, véanse las instrucciones de uso de los tests respectivos, así como de los luminómetros empleados.

Aseguramiento de la calidad analítica:

La norma DIN EN ISO 11348-3 prescribe el cumplimiento de determinados criterios de validez. Con el certificado de control adjunto, MACHEREY-NAGEL garantiza el cumplimiento dichos criterios.

No obstante, la norma mencionada recomienda asimismo al usuario controlar en el laboratorio la sensibilidad de las bacterias luminiscentes. La información requerida para la realización de dicho control – p. ej. las sustancias de referencia y concentraciones a usar – se encuentra en el certificado de control.

Valor pH:

Según la norma DIN EN ISO 11348-3, las muestras con un pH entre 6,0 y 8,5 no requieren un ajuste del mismo. Los valores de pH inferiores a 6,0 ó superiores a 8,5 pueden inhibir la luminiscencia. Para que el efecto tóxico causado por las desviaciones de pH sea despreciable, es necesario realizar un ajuste del pH.

Interferencias:

Las sustancias o componentes insolubles, difícilmente solubles o volátiles que reaccionan con el agua diluyente o la suspensión, así como aquéllas cambian de estado durante el ensayo, pueden falsificar o afectar la reproducibilidad de los resultados.

En muestras turbias o fuertemente coloreadas (especialmente rojas o marrones), pueden producirse pérdidas de luz por absorción o dispersión. Estas interferencias pueden compensarse preparando previamente las muestras (centrifugación o sedimentación) o empleando cubetas de corrección de color (REF 940006), en conformidad con el método descrito en la norma DIN EN ISO 11348, Anexo A.

En las muestras que consumen mucho oxígeno o en aquéllas con un contenido bajo del mismo, la falta de oxígeno puede inhibir la luminiscencia, ya que éste es un elemento necesario para la producción de luz en los organismos vivos (> 3 mg/L).

Si la muestra de agua contiene nutrientes fácilmente biodegradables, puede producirse una disminución de la bioluminiscencia sin que hayan sustancias contaminantes.

Como el organismo usado para el ensayo es la bacteria marina *Vibrio fischeri*, al analizar muestras de agua de mar puede producirse un aumento de la bioluminiscencia quedando enmascarado cualquier efecto inhibitorio de la misma (DIN EN ISO 11348-Anexo D).

Una concentración de NaCl superior a 30 g/L en la muestra, o de otras sustancias de igual osmolaridad puede causar, en combinación con las sales de agregadas durante el ensayo, efectos hiperosmóticos. Para evitar esto, la concentración de sal resultante no debería ser mayor que la osmolaridad correspondiente a 35 g/L en una solución de cloruro sódico. Igualmente, las muestras que contienen cloro falsifican los resultados del ensayo por lo que tienen que ser descloradas previamente, p. ej. agregándoles una solución de tiosulfato sódico al 1%.

Eliminación:

Las bacterias luminiscentes y las soluciones preparadas para el ensayo pueden verterse sin problemas en el desagüe. Si la muestra contiene sustancias nocivas para la salud o venenosas (que requieran eliminación especial), esto no siempre estará permitido. Es responsabilidad del usuario eliminar las soluciones mencionadas en conformidad con las directivas y disposiciones legales aplicables.

Bibliografía:

DIN EN ISO 11348-3 : 2009-05

Determinación del efecto inhibitorio de las muestras de agua sobre la luminiscencia de *Vibrio fischeri* (Ensayo de bacterias luminiscentes); Parte 3: Método con bacterias liofilizadas.

BioFix® Lumi lichtgevende bacteriën

volgens DIN EN ISO 11348-3: 2009-05, DEV L53

Methode:

Bepaling van de acute toxiciteit op **gevriesdroogde** lichtgevende bacteriën volgens DIN EN ISO 11348-3. Meetbare grootte is het natuurlijke lichtgevende vermogen (luminescentie) van het toegepaste micro-organisme *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Onderzocht wordt de remming van de lichtintensiteit door het monster in vergelijking met een ongeremde controletoebereiding. De hoogte van de remming van de lichtintensiteit in het monster is een maat voor de toxiciteit ervan.

Toepassing:

Afvalwater, waterige extracten en percolatiewater, zoetwater (oppervlaktewater en grondwater), zeewater en brak water, eluaten van sedimenten (zoetwater, brak water en zeewater), poriënwater, individuele stoffen in water opgelost.

Meetbereik:

0 – 100% remming

Opgave van de resultaten:

- % **remming** van de lichtintensiteit in het monster in vergelijking met een ongeremde controle.
- **G₁₀-waarde** (volgens DIN EN ISO 11348-3/bijlage B): reciproque waarde van de eerste verdunningsfase van een monster, waarbij de remming van de lichtintensiteit minder dan 20% is.
- **EC_{xx}**: concentratie van een monster die een remming van de lichtintensiteit van precies xx% veroorzaakt (bijv. EC₅₀-waarde: concentratie van het monster die een remming van de lichtintensiteit van 50% teweegbrengt).
- **TU-waarden** ("Toxicity units" volgens de definitie van de Amerikaanse milieuautoriteit US EPA): 100 gedeeld door EC₅₀-waarde.

Inhoud:	REF 945002
voldoende voor	2000 bepalingen
	20 buisjes met gevriesdroogde lichtgevende bacteriën volgens DIN EN ISO 11348-3
	1 flesje met 25 mL 'BioFix® Lumi reconstitutie-oplossing'
	REF 945003
voldoende voor	1000 bepalingen
	10 buisjes met gevriesdroogde lichtgevende bacteriën volgens DIN EN ISO 11348-3
	1 flesje met 15 mL 'BioFix® Lumi reconstitutie-oplossing'

Gevareidentificatie:

Deze testkit bevat geen gevaarlijke stoffen met verplichte kenmerking. De lichtgevende bacteriestam *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 is nog nooit als ziekteverwekker opgevallen. Volgens het informatieblad B006 1/92 ZH 1/346 van de beroepsvereniging van de chemische industrie is *Vibrio fischeri* bij risicogroep 1 ingeschaald, d.w.z. er bestaat geen gevaar voor mensen en gewervelde dieren.

Benodigd toebehoren:

BioFix® Lumi medium voor gevriesdroogde lichtgevende bacteriën" (REF 945608), reageerbuisjes 50 x 12 mm (REF 916 912)

Bewaring:

De reageerbuisjes met de gevriesdroogde BioFix® Lumi lichtgevende bacteriën zijn bij -15 °C tot -21 °C houdbaar tot de op de verpakking aangegeven vervaldatum. Het "BioFix® Lumi Reconstitutie-oplossing" kan ontdooid in de koelkast bij +2 °C tot +8 °C tot de opgedrukte houdbaarheidsdatum bewaard worden.

Haal de gevriesdroogde lichtgevende bacteriën pas vlak voor de reactivering uit het vriesvak. Gereactiveerde lichtgevende bacteriën dienen zoveel mogelijk binnen 4 uur te worden verbruikt! Een tussentijdse opslag van de gereactiveerde lichtgevende bacteriën is **uitsluitend in verdunde toestand (zie stap 2/variant B)** in de koelkast bij +2 °C tot +8 °C toegestaan.

Tijdens de bewaartijd van de gereactiveerde lichtgevende bacteriën kan de natuurlijke lichtintensiteit minder worden en een verschuiving van het gevoeligheidsspectrum ontstaan. Opnieuw invriezen van de gereactiveerde lichtgevende bacteriën wordt afgeraden en valt niet onder de garantie van MACHERY-NAGEL.

Reactivering en dosering van de gevriesdroogde BioFix® Lumi lichtgevende bacteriën:

De reactivering en dosering (optioneel variant A of variant B) van gevriesdroogde BioFix® Lumi lichtgevende bacteriën geschiedt onafhankelijk van de test steeds op dezelfde wijze.

Belangrijk:

Voor details omtrent de verdere uitvoering van de test zie de gebruiksaanwijzingen van de desbetreffende tests en testsystemen!

Stap 1: Reactivering
1. Haal een diepgevroren buisje met BioFix® Lumi lichtgevende bacteriën uit het vriesvak en haal de voorgekoelde fles met „BioFix® Lumi reconstitutieoplossing“ uit de koelkast.
2. Zo snel mogelijk 1 mL naar +2 °C tot +8 °C voorgekoelde 'BioFix® Lumi reconstitutie-oplossing' op de BioFix® Lumi lichtgevende bacteriën gieten ('shockontdoeien').
3. Los de lichtgevende bacteriën op door het buisje meerdere malen te schudden.
4. Vul de lichtgevende bacteriën in een daartoe geschikt reageerbuisje (50 x 12 mm, REF 916912) en bewaar ze vóór verdere verwerking gedurende 5 min ter stabilisering tijdelijk bij +2 °C tot +8 °C (bijv. in de voorraadkoker voor lichtgevende bacteriën van de luminometer Microtox® Model 500).

Stap 2: Dosering	
Variant A:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vul in ieder klaargezet reageerbuisje met testtoebereiding 0,5 mL voorgekoeld „BioFix® Lumi medium voor gevriesdroogde lichtgevende bacteriën“ (REF 945608). 2. Voeg er vervolgens telkens 10 µL gereactiveerde, onverdunde suspensie van lichtgevende bacteriën aan toe. 3. Gedurende 15 min bij +15 °C tempereren. 4. Start van de test door meting van het gegeven licht bij aanvang I₀. <p>Belangrijk! Na het meten van het gegeven licht bij aanvang en vóór toevoeging van de controle- of testoplossing de cuvetten tijdens de incubatietijd bij +15 °C tempereren.</p> <p><i>Details omtrent de verdere uitvoering van de test kunnen worden ontleend aan de handleidingen en handboeken van de bij de tests gebruikte luminometers.</i></p>
Variant B:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Meng in een bekerglas van geschikte grootte in de verhouding 1 + 50 gereactiveerde, onverdunde suspensie van lichtgevende bacteriën met naar +2 °C tot +8 °C voorgekoelde 'BioFix® Lumi Medium voor gevriesdroogde lichtgeve de bacteriën' (REF 945608) (bijv. 0,5 mL gereactiveerde lichtgevende bacteriën + 25 mL medium). 2. Vul telkens 0,5 mL van deze verdunde, gereactiveerde suspensie van lichtgevende bacteriën in ieder klaargezet reageerbuisje met testtoebereiding. 3. Gedurende 15 min. bij +15 °C tempereren 4. Start van de test door meting van het gegeven licht bij aanvang I₀. <p>Belangrijk! Na het meten van het gegeven licht bij aanvang en vóór toevoeging van de controle- of testoplossing de cuvetten tijdens de incubatietijd bij +15 °C tempereren</p> <p><i>Details omtrent de verdere uitvoering van de test kunnen worden ontleend aan de handleidingen en handboeken van de bij de tests gebruikte luminometers.</i></p>

Analytische kwaliteitsborging:

In de DIN EN ISO 11348-3 wordt de nakoming van bepaalde geldigheidscriteria vereist. Met het bijgevoegde keuringscertificaat garandeert MACHERY-NAGEL dat er aan de gevorderde geldigheidscriteria is voldaan.

De gevoeligheid van de geleverde lichtgevende bacteriën moet volgens de norm ook in het eigen laboratorium worden gecontroleerd. De daarvoor noodzakelijke informatie zoals standaardsubstanties en testconcentraties kunnen worden ontleend aan het bijgevoegde testcertificaat.

pH-waarde:

Volgens de DIN EN ISO 11348-3 is er geen pH-correctie van het monster nodig wanneer de pH-waarde tussen 6,0 en 8,5 ligt. pH-waarden van minder dan 6,0 of groter dan 8,5 kunnen leiden tot pH-inherente lichtremmingen. Moet het eventuele toxische effect van de pH-waarde buiten beschouwing blijven, dan moet deze worden ingesteld.

Interferenties:

Niet opgeloste, moeilijk oplosbare of vluchtige stofbestanddelen of stoffen die met het verdunningswater of met de testsuspensie reageren of tijdens de test van toestand veranderen, kunnen het testresultaat vervalsen of de reproduceerbaarheid van de testresultaten nadelig beïnvloeden.

Bij sterk gekleurde (met name rood of bruin gekleurd) of troebele monsters kan er lichtverlies door absorptie of lichtverstrooiing optreden. Deze storingen kunnen door een voorbehandeling van de monsters (afzetting of centrifugeren) of bijv. door gebruik van kleurcorrectie-cuvetten met dubbele wanden (REF 940006) analoog aan de methode volgens DIN EN ISO 11348, bijlage A worden gecompenseerd.

Omdat voor de bioluminescentie zuurstof nodig is (> 3 mg/L), kan er bij sterk zuurstof verterende monsters of monsters met een gering zuurstofgehalte een zuurstofgebrek optreden dat kan leiden tot een remming van de lichtemissie.

Krijgt het watermonster biologisch gemakkelijk afbreekbare voedingsstoffen, dan kan er een niet door schadelijke stoffen veroorzaakte afname van de bioluminescentie optreden.

Omdat het bij het testorganisme *vibrio fischeri* gaat om een zeebacterie, leidt het onderzoek van zeewaterhoudende monsters vaak tot een verhoging van de bioluminescentie, waardoor remmende werkingen kunnen worden gemaskeerd (DIN EN ISO 11348-bijlage D).

Zoutconcentraties in het watermonster van meer dan 30 g/L NaCl of stofconcentraties van andere substanties met dezelfde osmolariteit kunnen samen met de in de test vereiste zoutaanvulling leiden tot hyperosmotische effecten. Ter vermindering van deze effecten dient de resulterende zoutconcentratie de osmolariteit van een natriumchloride-oplossing van 35 g/L NaCl niet te overschrijden.

Ook chloorhoudende monsters storen de uitvoering van de test en moeten vóór het begin van de test worden gedechlorreerd, bijv. door toevoeging van een natriumthiosulfaat-oplossing van 1%.

Opruiming:

Lichtgevende bacteriën en testtoebereidingen kunnen probleemloos via de gootsteen verwijderd worden. Er kunnen beperkingen ontstaan, wanneer het monster substanties bevat die gevaarlijk voor de gezondheid of giftig zijn en waarvoor een specifieke verwijdering verplicht is. De gebruiker is ervoor verantwoordelijk dat dergelijke testtoebereidingen volgens de ter plaatse geldige richtlijnen en voor-schriften verwijderd worden.

Literatuur:

DIN EN ISO 11348-3 : 2009-05

Bepaling van de remwerking van watermonsters op de lichtemissie van *Vibrio fischeri* (test lichtgevende bacteriën); deel 3: Procédé met gevriesdroogde bacteriën.

REF 945002 / 945003

04.23

it

BioFix® Lumi Batteri luminescenti

secondo DIN EN ISO 11348-3: 2009-05, DEV L53

Metodo:

Determinazione di effetti tossici acuti su batteri luminescenti liofilizzati ai sensi della norma DIN EN ISO 11348-3. Il parametro misurato è l'energia luminosa (bioluminescenza) naturalmente emessa dal microorganismo *Vibrio fischeri*, ceppo NRRL B-11177. Questo test determina l'effetto inibitorio del campione in esame sull'emissione luminosa dei batteri luminescenti rispetto a una soluzione di controllo in cui non sono presenti sostanze tossiche (bianco). La percentuale di inibizione della luminescenza è indice del grado di tossicità del campione.

Utilizzo:

Acque reflue, estratti acquosi e percolati, acque dolci (superficiali e sotterranee), acque marine e salmastre, eluati di sedimenti (acque dolci, acque salmastre e marine), acque interstiziali nonché singole sostanze disciolte in acqua.

Campo di misura:

Inibizione 0 – 100%

Espressione dei risultati:

- **Percentuale di inibizione:** inibizione dell'emissione luminosa del campione rispetto a una soluzione di controllo (bianco).
- **Tossicità rilevata sui batteri luminescenti** (valore LID secondo DIN EN ISO 11348-3/annesso B): reciproco della prima diluizione di un campione che determina una riduzione della luminescenza inferiore al 20 %.
- **Concentrazione effettiva (EC_{xx}):** concentrazione di un campione che causa esattamente il xx% di inibizione dell'emissione di luce (ad es. EC₅₀: concentrazione del campione che provoca un'inibizione della luminescenza del 50 %).
- **Unità tossiche (TU):** calcolate in base alla formula $100/EC_{50}$ approvata dall'EPA.

Contenuto:	REF 945002
per massimo	2000 determinazioni
	20 vial con batteri luminescenti allo stato liofilo e congelato come da DIN EN ISO 11348-3
	1 flacone da 25 mL di soluzione ricostituente BioFix® Lumi
	REF 945003
per massimo	1000 determinazioni
	10 vial con batteri luminescenti allo stato liofilo e congelato come da DIN EN ISO 11348-3
	1 flacone da 15 mL di soluzione ricostituente BioFix® Lumi

Indicazioni di pericolo:

Questo test non contiene sostanze pericolose soggette a obbligo di etichettatura.

Per il ceppo di batteri luminescenti *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 non è nota alcuna patogenicità. Nel suo foglio informativo B006 1/92 ZH 1/346, l'Associazione Professionale dell'Industria Chimica tedesca ha assegnato *Vibrio fischeri* al gruppo di rischio 1, classificandolo quindi come microorganismo non suscettibile di provocare malattie umane e animali.

Materiali e reagenti richiesti:

Mezzo di incubazione BioFix® Lumi per batteri luminescenti liofilizzati (REF 945608), cuvette di vetro 50 x 12 mm (REF 916912)

Immagazzinamento:

I vial di reazione con i batteri luminescenti allo stato liofilo e congelato BioFix® Lumi possono essere utilizzati fino alla data di scadenza riportata sulla confezione unicamente se conservati a temperature comprese tra -15 °C e -21 °C. La soluzione ricostituente BioFix® Lumi può essere utilizzata fino alla data di scadenza indicata se conservata non congelata a temperature comprese tra +2 °C e +8 °C.

Estrarre dal congelatore i batteri luminescenti liofilizzati immediatamente prima della riattivazione. Dopo la riattivazione, si consiglia di utilizzare i batteri luminescenti entro un intervallo di tempo di massimo 4 ore! I batteri luminescenti riattivati possono essere conservati nuovamente in frigorifero a temperature comprese tra +2 °C e +8 °C **soltanto dopo essere stati diluiti (si veda passaggio 2/procedura B).**

La conservazione comporta un decremento spontaneo progressivo dell'emissione luminosa naturale dei batteri nonché un'alterazione dello spettro di sensibilità. Si sconsiglia vivamente di non ricongelare i batteri luminescenti riattivati. In caso di ricongelamento, MACHEREY-NAGEL è esonerata da ogni obbligo di garanzia.

Riattivazione e dosaggio dei batteri luminescenti liofilizzati BioFix® Lumi:

La riattivazione e il dosaggio (procedura A o procedura B) dei batteri luminescenti liofilizzati BioFix® Lumi si eseguono sempre allo stesso modo indipendentemente dalla tipologia del saggio.

Nota bene:

Per maggiori dettagli in merito al susseguente procedimento analitico si rimanda alle istruzioni per l'uso dei singoli test/sistemi di saggio nonché ai manuali operativi dei luminometri utilizzati.

Passaggio 1: Riattivazione

1. Estrarre dal congelatore un vial di batteri luminescenti BioFix® Lumi e dal frigorifero il flacone della soluzione ricostituente „BioFix® Lumi“.
2. **Aggiungere** il più velocemente possibile **1 mL di soluzione ricostituente BioFix® Lumi** raffreddata a temperature comprese tra +2 °C e +8 °C ai batteri luminescenti BioFix® Lumi congelati (scongelo rapido).
3. Scuotere ripetutamente il vial di reazione fino ad ottenere una sospensione batterica.
4. Trasferire la sospensione di batteri luminescenti riattivati in cuvette di vetro idonee (50 x 12 mm, REF 916912) e, prima di procedere, stabilizzarla per 5 min. a temperature comprese tra +2 °C e +8 °C (ad es. riponendo il vial in un pozzetto del luminometro Microtox® M 500).

Passaggio 2: Dosaggio

Procedura A: 1. Introdurre 0,5 mL del mezzo di incubazione per batteri luminescenti liofilizzati BioFix® Lumi (REF 945608) in ciascuna cuvetta predisposta per il saggio.
2. Aggiungere quindi **10 µL di sospensione non diluita di batteri luminescenti riattivati**.
3. Incubare per **15 min. a +15 °C**.
4. Iniziare il saggio **effettuando la lettura della luminescenza emessa a tempo 0 t₀**.
Attenzione: dopo la lettura della luminescenza a tempo 0 e prima di aggiungere la soluzione di controllo o campione incubare le cuvette a +15 °C.
Per maggiori dettagli in merito al susseguente procedimento analitico si rimanda alle istruzioni per l'uso e ai manuali operativi dei luminometri utilizzati

Procedura B: 1. Miscelare in un beaker di dimensioni adeguate la **sospensione non diluita di batteri luminescenti riattivati** e il mezzo di incubazione per batteri luminescenti liofilizzati BioFix® Lumi (REF 945608) preraffreddato a temperature comprese tra +8 °C e +2 °C in un **rapporto 1 + 50** (ad es. 0,5 mL di batteri luminescenti riattivati + 25 mL del mezzo di incubazione).
2. Trasferire **0,5 mL della sospensione diluita di batteri luminescenti riattivati** in ciascuna cuvetta predisposta per il saggio.
3. Incubare per **15 min. a +15 °C**.
4. Iniziare il saggio **effettuando la lettura della luminescenza emessa a tempo 0 (t₀)**.
Attenzione: dopo la lettura della luminescenza a tempo 0 e prima di aggiungere la soluzione di controllo o campione incubare le cuvette a +15 °C.
Per maggiori dettagli in merito al susseguente procedimento analitico si rimanda alle istruzioni per l'uso e ai manuali operativi dei luminometri utilizzati.

Assicurazione della qualità analitica:

La norma DIN EN ISO 11348-3 prescrive il soddisfacimento di determinati criteri di validità. Con l'allegato certificato di controllo, MACHEREY-NAGEL garantisce il soddisfacimento dei criteri richiesti.

In conformità con la norma sopra menzionata, l'utilizzatore finale è tenuto a controllare nel proprio laboratorio la sensibilità dei batteri luminescenti forniti. Le informazioni necessarie a tal fine, quali le sostanze di riferimento e le concentrazioni di saggio, sono riportate nel certificato di controllo allegato.

pH:

In coerenza con la norma DIN EN ISO 11348-3 non è richiesta alcuna correzione del pH se il campione ha un pH da 6,0 a 8,5. Valori di pH inferiori a 6,0 o superiori a 8,5 possono influire sulla sopravvivenza dei batteri inibendone la naturale luminosità. Per minimizzare gli effetti tossici correlati al pH, il valore di quest'ultimo deve essere corretto.

Interferenze:

Sostanze insolubili o scarsamente solubili in acqua, composti che possono reagire con l'acqua di diluizione / sospensione del saggio o che si possono alterare durante le prove possono influenzare l'attendibilità dei risultati o pregiudicarne la riproducibilità.

Campioni fortemente colorati (soprattutto di colore rosso o marrone) o torbidi possono provocare perdite di luminescenza dovute ad assorbimento o diffusione della luce. Conformemente alla procedura descritta nella norma DIN EN ISO 11348, annesso A, tali interferenze possono essere minimizzate mediante trattamento preliminare del campione (sedimentazione o centrifugazione) o, ad esempio, utilizzando delle cuvette a doppia camera (REF 940006).

Poiché per la bioluminescenza è richiesto ossigeno in concentrazione > 3 mg/L, i campioni con un'elevata domanda e/o una bassa concentrazione di ossigeno possono determinare una carenza di ossigeno e presentare quindi un effetto inibitorio sull'emissione di luce.

La presenza di nutrienti facilmente biodegradabili nel campione acquoso può provocare un'inibizione della bioluminescenza anche in assenza di sostanze tossiche.

L'organismo *Vibrio fischeri* utilizzato per la prova è un batterio marino, ragion per cui la presenza di acqua marina nel campione analizzato determina effetti di stimolazione della bioluminescenza che possono mascherare eventuali inibizioni della stessa (DIN EN ISO 11348, annesso D).

Una concentrazione di NaCl superiore a 30 g/L nel campione acquoso, o di altre sostanze con osmolarità simile, può determinare, in concomitanza con la salatura prevista dal test, effetti iperosmotici. Per evitarli, la concentrazione di sale complessiva non deve superare l'osmolarità di una soluzione contenente 35 g/L di NaCl.

Campioni a contenuto di cloro influenzano l'attendibilità dei risultati e devono essere dichiarati prima del saggio (ad es. con una soluzione di tiosolfato di sodio all'1 %).

Smaltimento:

I batteri luminescenti e le soluzioni preparate per il saggio si possono rilasciare nelle acque reflue. Restrizioni sono date nel caso in cui il campione contiene sostanze specifiche dannose per la salute o velenose che richiedono uno smaltimento speciale. L'utilizzatore finale è responsabile dello smaltimento regolare di dette soluzioni in accordo con le direttive e le disposizioni vigenti.

Riferimenti bibliografici:

DIN EN ISO 11348-3 : 2009-05

Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di *Vibrio fischeri* (prova su batteri luminescenti); parte 3: metodo con batteri liofilizzati