REF 945023 / 945024 05.23

de

BioFix® *Lumi* Leuchtbakterien, flüssiggetrocknet

nach DIN EN ISO 11348-2:2009-05, DEV L52

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:
Abwasser, wässrige Extrakte und Sickerwasser, Süßwasser (Oberflächen- und Grundwasser), Meer- und Brackwasser, Eluate von Sedimenten (Süß,- Brack- 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
- **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. EC_{50}-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 EC_{50}-Wert.

Inhalt:	**REF 945023**
ausreichend für	200 Bestimmungen
	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 Flasche mit 50 mL „BioFix® *Lumi* Standard-Lösung"
	REF 945024
ausreichend für	400 Bestimmungen
	20 Röhrchen mit flüssiggetrockneten Leuchtbakterien nach DIN EN ISO 11348-2
	20 Röhrchen mit „BioFix® *Lumi* Reaktivierungslösung" nach DIN EN ISO 11348-2, fertig portioniert
	1 Flasche mit 50 mL „BioFix® *Lumi* Standard-Lösung"

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.

Lagerung:
Die Testreagenzien sind bei -15 °C bis -21 °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 reaktivierter 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 der entsprechenden Teste, Testsysteme und Handbüchern der jeweils verwendeten Luminometer zu entnehmen!

Arbeitsschritt 1: Reaktivierung

1. „**BioFix® *Lumi* Reaktivierungslösung**" dem Tiefkühlfach entnehmen, auftauen und in einem geeignetem Thermoblock (oder Wasserbad) **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 (oder Wasserbad) **15 min** bei **+15 °C** temperieren.

Arbeitsschritt 2.1: Dosierung bei Messung ohne 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 I_0**.

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.

oder

Arbeitsschritt 2.2: Dosierung bei Messung mit GL1

1. **Zugabe von 4 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 und 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 I_0**.

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 11348-2 wird die Einhaltung bestimmter Gültigkeitskriterien gefordert. Mit dem beigefügten Prüfzertifikat wird von MACHEREY-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 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. 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 Testsuspension 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 Probenvorbehandlung (Absetzen oder Zentrifugieren) oder z. B. durch Verwendung von Farbkorrektur-Küvetten mit Doppelwänden (REF 940006) in Anlehnung an das Verfahren nach DIN EN ISO 11348-2, 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.
Da es sich bei dem Testorganismus *Vibrio fischeri* um ein marines Bakterium handelt, führt die Untersuchung von meerwasserhaltigen Proben häufig zu einer Erhöhung der Biolumineszenz, wodurch Hemmwirkungen maskiert werden können (DIN EN ISO 11348-2, 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 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 11348-2:2009-05 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 Schlammuntersuchungen der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) P-9/8

MACHEREY-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: MACHEREY-NAGEL AG · Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Schweiz
Tel.: 062 388 55 00 · sales-ch@mn-net.com

PD 14122 / A029185 / 945023-945024 / xxxx

REF 945023 / 945024 05.23 en

BioFix® *Lumi* Luminescent bacteria, liquid-dried according to DIN EN ISO 11348-2:2009-05, DEV L52

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:
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.

Measurement range:
0 – 100 % inhibition

Indication 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 %.
- **EC_{xx}**: Concentration of a sample that causes an inhibition of the light intensity of exactly xx % (e.g. EC_{50}-Value: Concentration of the sample that causes an inhibition of the light intensity of 50 %).
- **TU-Values** (**T**oxicity **U**nits according to the definition of the American Environmental Protection Agency U.S. EPA): 100 divided by EC_{50}-Value.

Contents:	**REF 945023**
sufficient for	200 determinations
	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
	REF 945024
sufficient for	400 determinations
	20 vials with liquid-dried luminescent bacteria according to DIN EN ISO 11348-2
	20 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

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.

Storage:
The test reagents can be kept at -15 °C to -21 °C until the date indicated on the packaging. The liquid-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! Intermediate storage of reactivated luminescent bacteria must only be in undiluted state (see step 1) in a fridge at +2 °C to +8 °C.
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 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 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 of **"BioFix® *Lumi* Reactivation Solution"**, thaw out, and maintain a temperature of **+15 °C** in a suitable thermoblock (or water bath).
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 (or water bath) 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 I_0**.

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.

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 4 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 I_0**.

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.

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

Analytical quality assurance:
The compliance of certain validity criteria is required by DIN EN ISO 11348-2. The compliance is guaranteed by MACHEREY-NAGEL by means of the enclosed test certificate.
According 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.
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 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 colored or turbid samples can cause losses of light due to light adsorption or scattering. In accordance with the procedure described in DIN EN ISO 11348-2, annex A, these effects can be minimized by an appropriate sample treatment (centrifugation or sedimentation) or by using color 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 11348-2 annex D).
Salt concentrations of the sample higher than 30 g/L NaCl or concentrations of other compounds with similar osmolarity 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 osmolarity corresponding to 35 g/L NaCl.
Clorine 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 11348-2:2009-05
Determination of the inhibitory effect of water samples upon the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test); part 2; procedure with 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-9/8

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

PD 14122 / A029185 / 945023-945024 / xxxx

REF 945023 / 945024 **05.23** fr

BioFix® *Lumi* Bactéries luminescentes, déshydratées

selon DIN EN ISO 11348-2:2009-05, DEV L52

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.

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 G_L** (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 %.
– **EC_{xx}** : concentration d'un échantillon qui entraîne une inhibition de la luminescence d'exactement xx % (par exemple valeur EC_{50} : 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 EC_{50}).

Contenu :	**REF 945023**
suffit pour	200 déterminations
	10 flacons contenant des bactéries luminescentes déshydratées selon DIN EN ISO 11348-2
	10 flacons de „BioFix® *Lumi* Solution de Réactivation“ selon DIN EN ISO 11348-2, pré-dosée
	1 flacon de solution standard prête à l'emploi (NaCl)
	REF 945024
suffit pour	400 déterminations
	20 flacons contenant des bactéries luminescentes déshydratées selon DIN EN ISO 11348-2
	20 flacons de „BioFix® *Lumi* Solution de Réactivation“ selon DIN EN ISO 11348-2, pré-dosée
	1 flacon 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 -15 et -21 °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 peur 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 inclue 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 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 !

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. (ou bain-marie)
2. Sortir un flacon 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. (ou bain-marie)

Démarche 2.1 : Dosage pour une mesure sans 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 I_0**.

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 advantage sur la suite de l'essai, veuillez consulter les instructions correspondantes et les guides d'utilisation des luminomètres respectivement utilisés !

ou

Démarche 2.2 : Dosage pour une mesure avec GL1

1. **Ajouter 4 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 et 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 I_0**.

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 advantage 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 11348-2 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 luminescentes 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 les substances standard et les concentrations des tests figurent 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 un incubation de 30 minutes à +15 °C.

Valeur du pH :
Conformément à l'énoncé de la norme DIN EN ISO 11348-2, 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 centrifugeage) 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 11348-2, 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 11348-2, 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 luminescentes 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 11348-2:2009-05
Détermination de l'effet inhibiteur d'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-9/8.

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner 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 / A029185 / 945023-945024 / xxxx

REF 945023 / 945024 05.23 es

BioFix® *Lumi* Bacterias luminiscentes, deshidratadas según DIN EN ISO 11348-2:2009-05, DEV L52

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 muestra, en comparación con la solución de control no inhibida. El grado de la inhibición indica la toxicidad de la muestra

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 G_L** (según DIN EN ISO 11348-2: **valor LID**): recíproco del primer factor de dilución de la muestra que presente una inhibición inferior al 20 %.
– **EC_{xx}**: Concentración de una muestra que presenta una inhibición de exactamente xx % (P. ej., el valor EC_{50}: Concentración de la muestra 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 EC_{50}.

Contenido:	**REF 945023**
máximo para	200 determinaciones
	10 tubos con bacterias luminiscentes deshidratadas (DIN EN ISO 11348-2)
	10 tubos con “BioFix® *Lumi* Solución Reactivante” (DIN EN ISO 11348-2), listos para el uso
	1 frasco con solución estándar (NaCl), listo para el uso
	REF 945024
máximo para	400 determinaciones
	20 tubos con bacterias luminiscentes deshidratadas (DIN EN ISO 11348-2)
	20 tubos con “BioFix® *Lumi* Solución Reactivante” (DIN EN ISO 11348-2), listos para el uso
	1 frasco con solución estándar (NaCl), listo para el uso

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 el grupo de riesgo 1, es decir, como NO peligrosa para las personas y animales vertebrados.

Almacenamiento:
Se pueden almacenar los reactivos hasta la fecha de vencimiento impresa en el embalaje, a una temperatura de -15 a -21 °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 intermediario de las bacterias luminosas, en el refrigerador (de 2 a 8 °C), es posible sólo en el estado puro, no diluido
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 BioFix® *Lumi* bacterias luminiscentes deshidratadas:
Independientemente de la muestra, la **reactivación** de las BioFix® *Lumi* bacterias luminiscentes deshidratadas se realiza siempre de la misma forma. La **dosis** de las bacterias luminiscentes 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.

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. Retire la **“BioFix® *Lumi* Solución Reactivante”** del congelador, la descongele y ajuste la temperatura para **+15 °C** utilizando un bloque de calentamiento adecuado. (o baño de maría)
2. Retire un tubo conteniendo **BioFix® *Lumi* bacterias luminiscentes deshidratadas** del congelador, inmediatamente antes de la reactivación, y agregue **1 mL “BioFix® *Lumi* Solución Reactivante”**.
3. **Descongele** el tubo con las bacterias luminiscentes, 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**. (o baño de maría)

Paso 2.1: Dosificación para el procedimiento sin 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 luminiscentes reactivadas** en cada una de las cubetas con las muestras.
3. Luego, ajuste la temperatura de las muestras para **+15 °C**, durante **15 min**.
4. Empezar la **muestra midiendo la emisión de luz 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.

o

Paso 2.2: Dosificación para el procedimiento con la medición del GL1

1. **Agregue 4 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 muestra y control) **destinadas a la determinación GL1**.
3. Mezcle las restantes bacterias **luminiscentes** resuspendidas con el resto de la **“BioFix® *Lumi* Solución Reactivante”**.
4. Vierta **0,5 mL** de la suspensión de **bacterias luminiscentes reactivadas** en cada una de las demás cubetas con las muestras.
5. Luego, ajuste la temperatura de las muestras para **+15 °C**, durante **15 min**.
6. Empezar la muestra midiendo la emisión de luz 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.

Aseguramiento de la calidad analítica:
La norma DIN EN ISO 11348-2 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.
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 la norma DIN EN ISO 11348-2, 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 11348-2, 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 inhibidor de la misma (DIN EN ISO 11348-2, 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 11348-2:2009-05
Determinación del efecto inhibidor de las muestras de agua sobre la luminiscencia de *Vibrio fischeri* (Ensayo de bacterias luminiscentes); Parte 2: Método con bacterias luminiscentes deshidratadas

Informativo AQS para la garantía de la calidad en el análisis de aguas, aguas residuales y suelo (LAWA) P-9/8 (en alemán)

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Alemania
Tel.: +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

PD 14122 / A029185 / 945023-945024 / xxxx

REF 945023 / 945024 **05.23** nl

BioFix® *Lumi* Lichtgevende Bacteriën, vloeibaar gedroogd

volgens DIN EN ISO 11348-2:2009-05, DEV L52

Methode:
Bepaling van de acute toxiciteit op vloeibaar gedroogde lichtgevende bacteriën volgens DIN EN ISO 11348-2. Meetbare grootheid 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.
– **G_L-waarde** (volgens DIN EN ISO 11348-2: **LID-waarde**): 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. EC_{50}-waarde: concentratie van het monster die een remming van de lichtintensiteit van 50 % teweegbrengt).
– **TU-waarden** („Toxicity units“ naar definitie van de Amerikaanse milieu-beschermingsinstantie U.S. EPA): 100 gedeeld door EC_{50}-waarde.

Inhoud:	**REF 945023**
voldoende voor	200 bepalingen
	10 reageerbuisjes met vloeibaar gedroogde lichtgevende bacteriën volgens DIN EN ISO 11348-2
	10 reageerbuisjes met „BioFix® *Lumi* Reactiverringsoplossing“ volgens DIN EN ISO 11348-2, klaar in porties verdeeld
	1 flesje met gebruiksklare standaardoplossing (NaCl)
	REF 945024
voldoende voor	400 bepalingen
	20 reageerbuisjes met vloeibaar gedroogde lichtgevende bacteriën volgens DIN EN ISO 11348-2
	20 reageerbuisjes met „BioFix® *Lumi* Reactiverringsoplossing“ volgens DIN EN ISO 11348-2, klaar in porties verdeeld
	1 flesje met gebruiksklare standaardoplossing (NaCl)

Gevarenidentificatie:
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.

Bewaring:
De testreagensen zijn bij -15 °C tot -21 °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 tot +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 koemn. 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.

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

Stap 1: Reactivering

1. „**BioFix® *Lumi* Reactiveringsoplossing**“ uit het diepvrieskastje nemen, ontdooien en **op +15 °C** in een geschikte thermoblok (of waterbad) **op temperatuur brengen**.
2. Een diepgevrozen reagensbuisje met **BioFix® *Lumi* lichtgevende bacteriën** onmiddellijk voor de reactivering uit het diepvrieskastje nemen en **toevoeging van 1 mL „BioFix® *Lumi* Reactiveringsoplossing“**.
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 (of waterbad) **15 min** bij **+15 °C** op temperatuurbrengen.

Stap 2.1: Dosering bij meting zonder GL1

1. De geresuspendeerde lichtgevende bacteriën **met de resterende „BioFix® *Lumi* Reactiveringsoplossing“ 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 **uitgangsschijnen I_0**.

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.

Details omtrent de verdere uitvoering van de test kunnen worden ontleend aan de handleidingen en handboeken van de bij de tests gebruikte luminometers.

of

Stap 2.2: Dosering bij meting met GL1

1. **Toevoeging van 4 mL „BioFix® *Lumi* Reactiveringsoplossing“** 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* Reactiveringsoplossing“ 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 **uitgangsschijnen I_0**.

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.

Details omtrent de verdere uitvoering van de test kunnen worden ontleend aan de handleidingen en handboeken van de bij de tests gebruikte luminometers.

Analytische kwaliteitsborging:
In de DIN EN ISO 11348-2 wordt de nakoming van bepaalde geldigheidscriteria vereist. Met het bijgevoegde keuringscertificaat garandeert MACHEREY-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.
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 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 11348-2, 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 11348-2, 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 vermijding 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 gedechloreerd, 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 voorschriften verwijderd worden.

Literatuur:
DIN EN ISO 11348-2:2009-05
Bepaling van de remwerking van watermonsters op de lichtemissie van *Vibrio fischeri* (test lichtgevende bacteriën); deel 3: Procédé met liquid-dried bacteriën.

AQS-toelichtingsblad voor de kwaliteitsgarantie bij water-, afvalwater- en slikonderzoeken van het samenwerkingsverband van de deelstaten Water (LAWA Duitsland) P-9/8

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Duitsland
Tel.: +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

PD 14122 / A029185 / 945023-945024 / xxxx

REF 945023 / 945024 05.23

it

BioFix® *Lumi* Batteri luminescenti, disidratati

secondo DIN EN ISO 11348-2: 2009 – 05, DEV L52

Metodo:
Determinazione di effetti tossici acuti su batteri luminescenti disidratati ai sensi della norma DIN EN ISO 11348-2. Il parametro misurato è l'energia luminosa (bioluminescenza) naturalmente emessa dal microrganismo *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).
– **Valore G_L** (conforme alla norma DIN EN ISO 11348-2: **Valore LID**): Il reciproco della prima fase di diluizione di un campione, dove l'inibizione dell'intensità luminosa è inferiore al 20 %.
– EC_{xx}: Concentrazione di un campione, che provoca un'inibizione dell'intensità luminosa di circa xx % (ad es., valore di EC_{50}: concentrazione del campione che causa un'inibizione dell'intensità luminosa del 50 %).
– **Valori TU** ("Toxicity units" o unità di tossicità secondo la definizione dell'EPA, l'Agenzia per la Protezione Ambientale degli Stati Uniti): 100 diviso il valore di EC_{50}.

Contenuto:	**REF 945023**
per massimo	200 determinazioni
	10 provette con batteri luminescenti disidratati conformemente della norma DIN EN ISO 11348-2
	10 provette contenenti la "BioFix® *Lumi* Soluzione Riattivante" conformemente della norma DIN EN ISO 11348-2, predosate
	1 flacone con soluzione standard pronta per l'uso (NaCl)
	REF 945024
per massimo	400 determinazioni
	20 provette con batteri luminescenti disidratati conformemente della norma DIN EN ISO 11348-2
	20 provette contenenti la "BioFix® *Lumi* Soluzione Riattivante" conformemente della norma DIN EN ISO 11348-2, predosate
	1 flacone con soluzione standard pronta per l'uso (NaCl)

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 microrganismo non suscettibile di provocare malattie umane e animali.

Immagazzinamento:
Il reagenti possono essere conservati a una temperatura di -15 °C e -21 °C fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Togliere i batteri dal congelatore solo immediatamente prima della riattivazione e lasciare scongelare. I batteri che sono stati riattivati devono essere utilizzati entro massimo 4 ore! La conservazione intermedia dei batteri luminescenti riattivati è consentita solo allo stato non diluito (cfr. fase 1), in frigorifero, a una temperatura compresa tra +2 °C e +8 °C. 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 BioFix® *Lumi* Batteri luminescenti disidratati:
La **riattivazione** dei BioFix® *Lumi* Batteri luminescenti disidratati avviene sempre secondo la stessa modalità, indipendentemente dal test. Il **dosaggio** dei batteri luminescenti risospesi dipende dal metodo di test prescelto secondo la norma DIN EN ISO 11348-2, escludendo il valore GL1 (fase 2.1) oppure calcolando il valore GL1 (fase 2.2).

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. Togliere **la „BioFix® *Lumi* Soluzione Riattivante"** dal congelatore, lasciare scongelare e **termostatare** fino alla temperatura di **+15 °C** in un termoblock (o bagnomaria) adatto.
2. Togliere dal congelatore una provetta congelata contenente i **BioFix® *Lumi* Batteri luminescenti** immediatamente prima della riattivazione e **aggiungere 1 mL di "BioFix® *Lumi* Soluzione Riattivante"**.
3. **Scongelare** i batteri luminosi a bagnomaria (a temperatura ambiente) **per 2 minuti e diluire**.
4. Infine, lasciar termostatare la provetta con i batteri ri-sospesi in un termoblock (o bagnomaria) appropriato per **15 minuti** alla temperatura di **+15 °C**.

Passaggio 2.1: Dosaggio per la rilevazione della luminosità escludendo il valore GL1

1. **Mescolare** i batteri ri-sospesi **con la restante parte di "BioFix® *Lumi* Soluzione Riattivante"**.
2. Versare 0,5 mL **di sospensione riattivata** in ciascuna delle cuvette preparate.
3. Termostatare alla temperatura di **+15 °C** per **15 minuti**.
4. Dare avvio al test **misurando** la **luminosità iniziale** o I_0.

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.

o

Passaggio 2.2: Dosaggio per la rilevazione della luminosità calcolando il valore GL1

1. **Aggiungere 4 mL di "BioFix® *Lumi* Soluzione Riattivante"** ai batteri luminescenti ri-sospesi e mescolare accuratamente.
2. **Versare 0,2 mL** di sospensione nelle **cuvette per calcolare il valore GL1** (controllo e campione).
3. Mescolare gli altri batteri ri-sospesi con la rimanenza di "BioFix® *Lumi* Soluzione Riattivante".
4. Nelle restanti cuvette già preparate versare **0,5 mL di sospensione riattivata**.
5. Termostatare alla temperatura di **+15 °C** per **15 minuti**.
6. Dare avvio al test **misurando** la **luminosità iniziale** o I_0.

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 11348-2 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.
Un controllo indipendente dalla norma può essere svolto usando la soluzione standard pronta all'uso, contenuta nel kit (NaCl). Mescolando 0,5 mL di questa soluzione con 0,5 mL di batteri luminosi ri-sospesi (fase 2.1), dopo 30 minuti di incubazione alla temperatura di +15 °C si ottiene un'inibizione dell'intensità luminosa di 40 – 60 %.

pH:
In coerenza con la norma DIN EN ISO 11348-2 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 11348-2, 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 11348-2, 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 declorati 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 11348-2: 2009-05
Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di *Vibrio fischeri* (prova su batteri luminescenti); parte 2: metodo con batteri disidratati

AQS-foglio di note per verifica della qualità a acqua-, acque reflue- e fangoanalisi (LAWA Germania) P-9/8

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Germania
Tel.: +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

PD 14122 / A029185 / 945023-945024 / xxxx