

REF 945 002 / 945 003

07.10

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_{10} 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_{50}):** 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 945 002
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 945 003
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 945 608), cubetas de vidrio de 50 x 12 mm (REF 916 912)

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 (50x12 mm, REF 916 912) 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:**
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 945 608).
 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:**
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 945 608) 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 940 006), 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.