

REF 945 023/945 024

12.11

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 EC₅₀: 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 EC₅₀.

Contenido:	REF 945 023
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 945 024
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 del 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 intermedio 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, 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, 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 940 006), 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 inhibitorio 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 verse 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 inhibitorio 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)