

REF 945 002 / 945 003

07.10

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 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).
- **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 (EC₅₀):** 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 945 002
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 945 003
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 microrganismo non suscettibile di provocare malattie umane e animali.

Materiali e reagenti richiesti:

Mezzo di incubazione BioFix® Lumi per batteri luminescenti liofilizzati (REF 945 608), cuvette di vetro 50 x 12 mm (REF 916 912)

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 916 912) 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 945 608) 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**.
- 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 945 608) 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**.
- 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 940 006).

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