

REF 945 023/945 024

12.11

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 microorganismo *Vibrio fischeri*, ceppo NRRL B-11177. Questo test determina l'effetto inibitorio del campione in esame sull'emissione luminosa dei batteri luminescenti rispetto a una soluzione di controllo in cui non sono presenti sostanze tossiche (bianco). La percentuale di inibizione della luminescenza è indice del grado di tossicità del campione.

**Utilizzo:**

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

**Campo di misura:**

Inibizione 0–100 %

**Espressione dei risultati:**

- **Percentuale di inibizione:** inibizione dell'emissione luminosa del campione rispetto a una soluzione di controllo (bianco).
- **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<sub>xx</sub>**: Concentrazione di un campione, che provoca un'inibizione dell'intensità luminosa di circa xx % (ad es., valore di EC<sub>50</sub>: 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<sub>50</sub>.

<b>Contenuto:</b>	<b>REF 945 023</b>
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)
	<b>REF 945 024</b>
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 microorganismo non suscettibile di provocare malattie umane e animali.

**Immagazzinamento:**

I 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 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 11348-2, 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 dechlorati 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