

**“Multi-Shot” Batteri luminosi
(secondo DIN EN ISO 11348-3)****Metodo:**

Determinazione della tossicità acuta su batteri luminosi **liofilizzati** secondo la norma DIN EN ISO 11348-3. La grandezza misurabile è la prestazione luminosa (luminescenza) naturale del microrganismo *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. L'inibizione dell'intensità luminosa viene accertata mediante il campione in confronto con il metodo di controllo non inibito. La grandezza dell'inibizione dell'intensità luminosa nel campione è la misura per la sua tossicità.

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 %

Indicazione dei risultati:

- % di **inibizione** dell'intensità luminosa nel campione in confronto con un controllo non inibito.
- **Valore G_L value** (secondo DIN EN ISO 11348-3: Valore LID): numero reciproco del primo stadio di diluizione di un campione sul quale l'inibizione dell'intensità luminosa è inferiore al 20 %.
- **EC_{xx}**: concentrazione di un campione, che provoca una inibizione dell'intensità luminosa di esattamente xx% (ad es. EC₅₀: concentrazione del campione, che provoca l'intensità luminosa del 50 %).
- **Valori TU** (“unità di tossicità” secondo la definizione dell'ente per la protezione ambientale americano U.S. EPA): 100 diviso per il valore EC₅₀.

Contenuto set di reagenti:

10 cuvette tonde con batteri luminosi liofilizzati secondo la norma DIN EN ISO 11348-3.

1 bottiglia con 75 mL del “BioFix® Lumi Medium reattivazione per “Multi-Shot” batteri luminosi”

1 bottiglia con 20 mL del “BioFix® Lumi Soluzione di controllo”

Avvertenze di pericolo:

Questo set di prove non contiene nessuna sostanza pericolosa e non è soggetto a marcatura. La matrice dei batteri luminosi *Vibrio fischeri* NRRL

B-11177 finora non è mai apparsa come agente patogeno. Stando al foglio istruzioni B000 1/92 ZH 1/346 dell'Istituto di assicurazione dell'industria chimica “Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie” *Vibrio fischeri* viene situato nel gruppo di rischio 1, cioè uomo e vertebrati non corrono nessun rischio.

Magazzinaggio:

Le cuvette tonde con batteri luminosi BioFix® Lumi liofilizzati sono inalterabili fino alla data di scadenza indicata sulla confezione alla temperatura di -20 ± 2 °C. Il “BioFix® Lumi Medium reattivazione per “Multi-Shot” batteri luminosi” e il “BioFix® Lumi Soluzione di controllo” può essere conservato in stato scongelato in frigorifero alla temperatura di +2 °C fino +8 °C fino alla data di inalterabilità stampata sulla confezione.

Togliere i batteri luminosi liofilizzati dal frigorifero immediatamente prima della loro reattivazione.

Un stoccaggio intermedio dei batteri luminosi reattivati può avvenire solo in frigorifero alla temperatura di +2 °C fino +8 °C.

Man mano che aumenta la durata di conservazione dei batteri luminosi reattivati può avere luogo una diminuzione della naturale intensità luminosa e una modificazione dello spettro di sensibilità. Non è consigliabile un ricongelamento di batteri luminosi reattivati, i quali non sarebbero più nemmeno oggetto delle prestazioni di garanzia da parte della MACHEREY-NAGEL.

Reattivazione e dosaggio dei batteri luminosi BioFix® Lumi liofilizzati:

La reattivazione e il dosaggio dei batteri luminosi BioFix® Lumi liofilizzati avvengono, indipendentemente dalla prova, sempre alla stessa maniera. 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.

Modulo di lavoro 1:	Reattivazione
1.	Togliere dallo scomparto congelatore un tubetto congelato con batteri luminosi BioFix® Lumi liofilizzati e la bottiglia preraffreddata con “BioFix® Lumi Medium reattivazione per “Multi-Shot” batteri luminosi”.
2.	Il più velocemente possibile aggiungere dapprima 6 mL del “BioFix® Lumi Medium reattivazione per “Multi-Shot” batteri luminosi” (“scongelo choc”).
3.	Sciogliere i batteri luminosi scuotendo più volte il tubetto.
4.	Prima di continuare con la lavorazione dei batteri luminosi reattivati mettere, allo scopo di una stabilizzazione, per 5 minuti in frigo alla temperatura di +2 °C fino +8 °C.
Modulo di lavoro 2:	Dosaggio
1.	In ogni cuvetta di prova preparata vengono immessi 0,5 mL della sospensione di batteri luminosi riattivati . Lasciare riposare per 10 minuti da 15 °C .
2.	Per l'ulteriore procedere vogliate consultare le rispettive istruzioni per le prove.

Garanzia della qualità analitica:

La norma DIN EN ISO 11348-3 chiede il rispetto di determinati criteri di validità. Con l'allegato certificato di prova, MACHEREY-NAGEL garantisce il rispetto dei detti criteri di validità.

Ai fini di una propria verifica e controllo del corretto funzionamento del sistema di prova l'utente stesso può eseguire una misurazione di controllo con le soluzioni standard nominate nella norma stessa. Le informazioni a ciò necessarie nonché le sostanze standard e le concentrazioni delle prove sono da rilevare dall'allegato certificato di prova.

Valore pH:

Secondo la norma DIN EN ISO 11348-3 con un valore pH della prova di 6,0 fino a 8,5 non è necessario procedere a una correzione. Solo quando il valore pH si trova al di fuori di questo campo, allora esso deve essere regolato su un pH di $7,0 \pm 0,2$. I valori pH più bassi di 6,0 o più grandi di 8,5 possono condurre a una inibizione della luminosità causata dal valore pH.

Disturbi:

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 11348-3, 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 11348-3, 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:

Batteri luminosi e composizioni di prova possono essere smaltiti senza alcun problema attraverso lo scarico. Possono esserci delle limitazioni solo nel caso

in cui la prova contenesse delle sostanze dannose alla salute o tossiche, o sostanze speciali per uno smaltimento speciale. Per il regolare smaltimento secondo la legge di tali composizioni di prova deve provvedere l'utente stesso attenendosi alle relative norme e regolamentazioni specifiche.

Letteratura:

DIN EN ISO 11348-3: Edizione maggio 2009

Determinazione dell'effetto inibitorio di prove d'acqua sulla emissione di luce di *Vibrio fischeri* (prova di batteri luminosi): parte 3: Processo con batteri luminosi liofilizzati.

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