



***Ecotoxiciteitstest:
bacteriële luminescentie-inhibitietest***



INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	3
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	3
4.1	APPARATUUR:	3
4.2	MATERIAAL.....	4
4.3	TESTORGANISMEN	4
5	REAGENTIA EN OPLOSSINGEN	4
5.1	OPLOSSINGEN	4
5.2	TESTOPLOSSINGEN.....	4
6	PROCEDURE	5
6.1	BLOOTSTELLINGSCONDITIONS.....	5
6.2	TESTUITVOERING.....	5
7	KWALITEITSCONTROLE	7
7.1	EERSTELIJNSCONTROLE	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
8	BEREKENINGEN & RAPPORTERING	7
8.1	BEREKENINGEN	7
8.2	RAPPORTAGE	7
9	REFERENTIES	8

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze methode is geschikt om de acute toxiciteit voor de zoutwaterbacterie *Vibrio fischeri* te bepalen van:

- Chemische stoffen die in water oplosbaar zijn onder de testcondities of die in een stabiele suspensie of dispersie blijven onder de testcondities.
- Diverse watermatrices: afval-, oppervlakte-, drink-, grondwater, ef-/influent, absorptievloeistoffen, uitloging, waterige oplossing,...

Deze procedure beschrijft het uitvoeren van 2 acute testprocedures, nl. de standaard- en de 100 % procedure. Voor details en andere toepassingen wordt verwezen naar de handleiding die met het eigen toestel en software wordt meegeleverd.

2 PRINCIPE

Bestaande normen

- NEN-EN-ISO 11348-3 (voor gelyofiliseerde bacteriën)
- AFNOR T90-320 (= NF EN ISO 11348-3)
- DIN 38412 L34

Standaard procedures

- Canada EPS 1/RM/24 november 1992

Het testorganisme is de mariene bacterie *Vibrio fischeri* (voorheen *Photobacterium phosphoreum*), een bioluminescentie bacterie. De sterkte van het luminescent signaal is een maat voor de fysiologische activiteit van de populatie. Het toxiciteitseffect wordt gemeten aan de hand van de daling in bioluminescentie in functie van de concentratie en in functie van de tijd.

3 OPMERKINGEN

Volgende definities zijn van toepassing:

- EC₅₀ : concentratie waarbij 50 % inhibitie van de lichtsterkte tov de controle wordt waargenomen (uitgedrukt in mg/l of in %)
- TU₅₀ = 100/EC₅₀: Toxic Units = Toxische eenheden = reciproke van de EC₅₀ waarde = verdunningsfactor die nodig is om het toxisch effect tot 50% te brengen. De toxiciteit uitdrukken in toxische eenheden heeft het voordeel dat een toenemend aantal TU wijst op een toenemende toxiciteit, terwijl de EC₅₀ omgekeerd evenredig is met de toxiciteit.

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 Apparatuur:

Luminometer

pH meter

saliniteitsmeter

4.2 Materiaal

Regelbare automatische pipetten met bijhorende pipetpunten

Repeteerpipet met bijhorende tips (volume 10 µl)

Klok

Cuvetten

4.3 Testorganismen

Species: *Vibrio fisherie* (NRRL-B-11177).

Bron:

Bv. Microtox[®] reagent (gelyofiliseerde bacteriën, bewaren op -20 °C)

Er zijn andere bronnen mogelijk: bv. Dr Lange

5 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

5.1 Oplossingen (worden samen met de bacteriën geleverd)

Reconstitutie- oplossing (ontdooivloeistof voor de bacteriën)

Diluent (verdunningsvloeistof)

Oplossing om het zoutgehalte te normaliseren aan de behoefte van de mariene bacterie

Fenolstandaard (100 mg/l)

NaOH pa

HCl pa

NaCl zuiver

5.2 Testoplossingen

Randvoorwaarden meten: pH, zuurstof, saliniteit en chloriden nameten, en een beoordeling over troebelheid en kleur in het testopzet meenemen.

- **pH: 6.0-8.0:** Bij overschrijding van deze randvoorwaarden voor pH kan de test in tweevoud worden uitgevoerd: met en zonder pH correctie
- **Zuurstof:** het zuurstofgehalte moet > 40%, zoniet het staal beluchten voor de meting.
- **Zoutgehalte : optimaal tussen 2 en 5 % zoutgehalte. De test wordt standaard uitgevoerd bij 2 % NaCl.**
 - Zoet- en brakwaterstalen kunnen met zout (NaCl) tot 2 % zoutgehalte worden aangepast.
 - Zoutwaterstalen worden niet aangepast.
- **Gechloreerde stalen**, waterstalen die gedecontamineerd werden met chloor zijn per definitie bacterievrij en dus toxisch. Indien nodig kunnen zulke stalen gedechloriseerd worden met een natriumthiosulfaatoplossing van 10 g/l (1 volume op 100 volumes staal = 1 %)
- **Troebele stalen.** Indien de deeltjes geen deel uitmaken van het staal wordt het staal gecentrifugeerd of gefiltreerd. Maken de deeltjes wel deel uit van het staal en zijn ze

beperkt aanwezig, wordt er een kleurencorrectie uitgevoerd (zie verder). Zijn er veel deeltjes aanwezig kan de *Solid Phase* procedure¹ worden uitgevoerd.

- **Gekleurde stalen.** Kleurencorrectie uitvoeren (zie hiervoor de handleiding van het eigen systeem)

Testconcentraties

In het ideale geval zijn de testconcentraties zodanig gekozen dat de EC₅₀ waarde bij het aantal standaardverduunningen (= 4) tussen concentratie 2 en 3 kan worden verwacht.

Voor Waterstalen worden in eerste instantie standaardverduunningen in de test gebruikt: 45-22.5-11.25-5.625 % van het oorspronkelijke staal. (Verduunningen in diluent).

Indien EC₅₀ < 11.25 % wordt het staal verder 1/2 verdund.

Indien EC₅₀ > 45% wordt de 100% procedure toegepast: testconcentraties zijn 90 of 100% en 3 verduunningen in de effectrange (45-100%) bv. 90 – 75 – 60 – 45%.

Voor chemische stoffen*: de *range finding* test wordt uitgevoerd met log₁₀ verduunningen met maximale testconcentratie 1g/l.

Uit deze preliminaire test wordt de concentratierange voor de *finale test* afgeleid. Bij voorkeur ligt de EC₅₀ waarde tussen concentraties 2 en 3 van de 4 geteste verduunningen in de standaardprocedure.

*Voor moeilijk oplosbare stoffen kan een solvent worden gebruikt. De eindconcentratie van het solvent in de test mag maximaal 1% bedragen, mag geen toxisch effect hebben en moet in alle verduunningen en in de controle even hoog zijn.

6 PROCEDURE

6.1 Blootstellingscondities

De test wordt uitgevoerd bij 15 °C. De bacterieoplossing wordt gedurende de test bewaard op 5 °C.

De blootstelling gebeurt in cuvetten.

De test wordt zonder replica's uitgevoerd. Herhaling van de test kan nuttig zijn wanneer het signaal niet uitgesproken is.

6.2 Testuitvoering

De testoplossingen worden zo kort mogelijk voor het starten van de proef bereid, tenzij is aangetoond dat het om stabiele oplossingen gaat.

Een correcte testuitvoering vergt uiterste nauwkeurigheid in het pipetteren van kleine volumes: gebruik precisiemateriaal en voer de acties correct uit.

Vorbereiding

Per experiment heb je nodig:

Standaardprocedure (hoogste concentratie is 45%)

- 1 cuvet voor de bacteriesuspensie (5°C)

¹ Voor procedure: zie handleiding Microtox®.

- 5 cuvetten om de eerste verdunningsreeks (A) in aan te maken,
- 5 cuvetten om de finale verdunningen (B) in aanwezigheid van bacteriesuspensie aan te maken.

100 % procedure

- 1 cuvet voor de bacteriesuspensie (5°C)
- 3 * 5 cuvetten om de verdunningsreeks in triplo aan te maken,

Vullen van de cuvetten

Verdunningsreeksen

Standaardprocedure

Verdunningsreeks A:

Verdunning 1 : 2500 µl staal + 250 µl zoutoplossing (90 %)

Verdunning 2: 1000 µl diluent + 1000 µl verdunning 1 (45 %)

Verdunning 3: 1000 µl diluent + 1000 µl verdunning 2 (22.5%)

Verdunning 4: 1000 µl diluent + 1000 µl verdunning 3 (11.25%)

Controle: 1000 µl diluent

Op het moment dat de meting start worden pas de finale verdunningen gemaakt.

Verdunningsreeks B

Doe in elke cuvet 500 µl diluent

Bereid de bacteriesuspensie zoals hieronder beschreven en voeg aan elke cuvet 10 µl bacteriesuspensie toe

Wacht 15 minuten

Start de klok en meet in elke cuvet de lichtsterkte na 5, 15 en 30 minuten.

Voeg nu 500 µl uit verdunning/controle uit de overeenkomstige A cuvetten toe aan de B cuvetten. De finale testconcentraties zijn dus 45 – 22.5 – 11.25 – 5.625 %

100% procedure

De verdunningsreeks zoals hierboven beschreven voor A wordt in 3 voud aangemaakt (A, B en C). Zoutoplossing kan vervangen worden door vast NaCl waardoor de hoogste testconcentratie 100% is ipv 90%.

De volumes in alle cuvetten worden op 1000µl gebracht.

Bereid de bacteriesuspensie zoals hieronder beschreven.

Voeg aan alle cuvetten 10 µl bacteriesuspensie toe. Start de klok en meet na 5, 15 en 30 minuten. Respecteer de volgorde waarmee de cuvetten gevuld werden zodat voor elke individuele cuvet de tussentijden gelijk zijn.

Bacteriesuspensie

Cuvet voro bacteriesuspensie: vul deze cuvet met reconstitutievloeistof volgens de handleiding van je eigen test systeem.

Let op: Om de temperatuur voldoende laag te houden wordt in praktijk de bacteriesuspensie pas aangemaakt nadat eerst de verdunningsreeks A is aangemaakt en in civetten voor verdunningsreeks B diluent is aangebracht (standaardprocedure), of - in de 100% procedure – de verdunningen in A, B en C zijn aangemaakt.

Neem een ingevroren recipiënt met bacteriën uit de diepvries en voeg zo snel mogelijk na de opening reconstitutievloeistof aan de bacteriesuspensie toe. De suspensie is maximaal 3 uur bruikbaar.

Metingen:

Meet de lichtsterkte in alle verdunningen met correcte tussenpauzen.

- a) Meet de basisactiviteit van de bacteriesuspensie (tijdstip 0).
- b) Voeg onmiddellijk de teststof toe.
- c) Meet na 5, 15 en 30 minuten blootstelling.

Kleurcorrectie:

Voor gekleurde stalen: zie de handleiding van het eigen systeem.

7 KWALITEITSCONTROLE

- De herkomst van de organismen moet getraceerd kunnen worden.
- Een referentiestof wordt voor elke aangemaakte bacteriesuspensie getest om te toetsen of de organismen een normale gevoeligheid vertonen. Als referentiestof wordt bv. fenol gebruikt waarvan de EC₅₀waarde tussen 13 en 26 mg/l moeten liggen bij elk van de tijdstippen.
- De EC₅₀ waarde moet gebaseerd zijn op interpolatie. Indien EC₅₀ niet in de geteste verdunningsreeks valt, de test herhalen met een aangepaste verdunningsreeks.
- De spontane lichtdaling in de blanco in de tijd mag maximaal 60% bedragen. Een te snelle lichtafname duidt op een slechte kwaliteit van de bacteriële batch.
- De variatie van de metingen op tijdstip 0 moet ≤ 10 %. Grotere afwijkingen wijzen op een pipetteerfout waardoor het bacterie-aantal niet gelijk is in iedere cuvet.
- De EC₅₀ variatie voor 2- of 3-voudige metingen moet < 10 % (enkel voor de 100 % procedure). Grotere afwijkingen wijzen op pipetteerfouten. De test moet worden herhaald wanneer de variatie > 10%.
- De gerapporteerde 95 % betrouwbaarheidsfactor moet < 1.5. Grotere waarden geven aanleiding tot onzekere waarden en kunnen duiden op een onstabiel toxiciteitsignaal.

8 BEREKENINGEN & RAPPORTERING**8.1 Berekeningen**

De berekeningen kunnen worden uitgevoerd door gebruik te maken van de bijgeleverde software (bv. Microtox Omni Windows®). Voor deze berekeningen wordt verwezen naar de handleiding van het eigen systeem.

Bij manuele berekeningen moet de methode gedetailleerd gerapporteerd worden.

De EC₅₀ waarden worden gerapporteerd voor de tijdstippen 5, 15 en 30 minuten, met de 95% betrouwbaarheidsgrenzen.

Naast EC₅₀ worden ook de Toxische eenheden (TU) gerapporteerd: TU₅₀ = 100/EC₅₀.

8.2 Rapportage

Het rapport bevat indien mogelijk:

- Samenvatting van de resultaten
- Referentie naar het protocol dat gevolgd wordt
- Uitvoeringsdatum

- Informatie over het monster
 - herkomst, code, aard, ...
 - Gemeten randvoorwaarden: indien niet voldaan moet dit duidelijk gerapporteerd worden en de mogelijke invloed op de resultaten worden aangegeven
 - Indien mocht blijken dat de stabiliteit of homogeniteit van de teststof niet kan worden gehandhaafd tijdens de test, moet dit duidelijk worden vermeld en is voorzichtigheid geboden bij de interpretatie van de resultaten.
- Informatie over de testorganismen
 - wetenschappelijke naam, leverancier, behandeling,
 - kwaliteit (uitgevoerde controles die de goede kwaliteit kunnen aantonen)
- Verantwoording testconcentraties
- Testverloop (specifieke testcondities, informatie over het meetsysteem, afwijkingen van het protocol)
- Informatie over de berekeningswijze
- Resultaten
 - Toetsing aan de aanvaardingscriteria
 - Effectwaarden
 - Wanneer er geen effecten worden waargenomen moet men aangeven dat het staal geen toxische effecten veroorzaakt voor de testorganismen binnen de testconcentratie-range en de gebruikte blootstellingstijd.
 - Indien effecten worden waargenomen rapporteer waar mogelijk:
 - EC50 waarden voor de 3 tijdstippen
 - Bespreking van de resultaten en eventuele invloeden door externe factoren/afwijkingen tijdens de test.

9 REFERENTIES

- NEN-EN-ISO 11348
- AFNOR T90-320 (= NF EN ISO 11348-3)
- DIN 38412 L34
- Canada EPS 1/RM/24 november 1992
- Ecotoxicity of Chemicals to *Photobacterium phosphoreum*. Handbooks of ecotoxicological data. Volume two. KLE Kaiser and J Devillers. Gordon and Breach Science Publishers. 1994.
- Microtox Manual. A Toxicity Testing Handbook. Microbics Corporation. Versie 1992. 5 delen.
- MicrotoxOmni™ Software for Windows® 95/98/NT, AZUR, versie 1999. CD-rom bevat naast het software programma en de bijhorende handleiding ook de uitgewerkte procedures, literatuur gegevens en allerlei nuttig informatie.