

Ecotoxiciteitstest: bacteriële luminescentie-inhibitietest

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	3
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	4
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
4.2	<i>Materiaal</i>	4
4.3	<i>Testorganismen</i>	4
5	REAGENTIA en OPLOSSINGEN	4
5.1	<i>Oplossingen (worden samen met de bacteriën geleverd)</i>	4
5.2	<i>Testoplossingen</i>	4
6	PROCEDURE	6
6.1	<i>Blootstellingscondities</i>	6
6.2	<i>Testuitvoering</i>	6
7	KWALITEITSCONTROLE	7
8	BEREKENINGEN & RAPPORTERING	8
8.1	<i>Berekeningen</i>	8
8.2	<i>Rapportage</i>	9
9	REFERENTIES	10

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 zgn. 100 % procedure (zie verder). Voor details en andere toepassingen wordt verwezen naar de handleiding die met het eigen toestel en software wordt meegeleverd.

Deze bepaling is een onderdeel van de ecotoxicologische beoordeling van (afval)waters, namelijk de meting van de toxiciteit voor het trofische niveau van micro-organismen.

2 PRINCIPE

Bestaande normen

- NEN-EN-ISO 11348 (Hier beschreven voor N°-3 voor gelyofiliseerde bacteriën). Anderen zijn toegelaten.
- 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, gecorrigeerd voor de spontane daling in functie van de tijd.

3 OPMERKINGEN

Volgende definities zijn van toepassing:

- EC_{50} : concentratie waarbij 50 % inhibitie van de lichtsterkte tov de controle wordt waargenomen (uitgedrukt in mg/l of in %)
- $TU = 100/EC_{50}$: Toxic Units = Toxische eenheden = reciproke van de EC_{50} 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 EC_{50} omgekeerd evenredig is met de toxiciteit.

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 APPARATUUR

Luminometer (met gethermostatiseerde plaatsen voor de blootstellingscuvetten en de bacterievoorraad)
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 (verduunningsvloeistof)
Oplossing om het zoutgehalte te normaliseren aan de behoefte van de mariene bacterie (OAS)
Fenolstandaard (100 mg/l)
NaOH pa
HCl pa
NaCl zuiver

5.2 TESTOPLOSSINGEN

Randvoorwaarden meten: meet zuurstof en pH in alle testoplossingen.

- De toegelaten ranges voor deze parameters staan hieronder vermeld. Bij overschrijding van deze voorwaarden kunnen effecten op de luminescentie verwacht worden. Overschrijdingen moeten duidelijk in het rapport vermeld worden.
-

Testorganisme	pH	Zuurstof (mg/l)
Vibrio	6.0 – 9.0	> 3

- **Zuurstof:** het zuurstofgehalte moet > **3 mg/l**, 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 procedure*¹ worden uitgevoerd.
- **Gekleurde stalen.** Kleurencorrectie uitvoeren (zie hiervoor de handleiding van het eigen systeem)

Testconcentraties

LIMIETTEST

In principe worden afvalwaters aan slechts 1 concentratie getest. Hiervoor wordt de 100% procedure gebruikt waarbij aan het afvalwater 10% zoutoplossing wordt toegevoegd en 0.01% bacteriesuspensie. De testconcentratie is ongeveer 90%.

De software ondersteunt deze limiettest niet zodat de berekeningen manueel moeten gebeuren.

VERDUNNINGSSREEKS

Wanneer EC50 waarde bepaald moet worden, wordt de test op een verdunningsreeks uitgevoerd. In het ideale geval zijn de testconcentraties zodanig gekozen dat de EC50 waarde bij het aantal standaardverdunningen (= 4) tussen concentratie 2 en 3 kan worden verwacht.

Voor waterstalen kan standaard:

- a) de Microtox standaardprocedure worden gebruikt waarbij volgende verdunningen worden getest: 45-22.5-11.25-5.625 % van het oorspronkelijke staal. (Verdunningen in diluent).
Indien $EC_{50} < 11.25$ % wordt het staal verder 1/2 verdund.
Indien $EC_{50} > 45$ % wordt de zgn. 100% procedure toegepast.
- b) de zgn. 100% procedure onmiddellijk worden toegepast. In deze procedure is de hoogste concentratie 81.9% of 90% en worden 9 opeenvolgende verdunningen getest (1/2 verdunningen). Volg de instructies behorend bij het eigen meetsysteem.

Voor chemische stoffen*: de *range finding* test wordt uitgevoerd met log10 verdunningen 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 verdunningen 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 verdunningen en in de controle even hoog zijn.

¹ Voor procedure: zie handleiding Microtox®.

6 PROCEDURE

6.1 BLOOTSTELLINGSCONDITIONS

De test wordt uitgevoerd bij 15 °C. De bacterieoplossing wordt gedurende de test bewaard op 5 °C. Bij microtox zijn deze temperaturen standaard ingesteld in het toestel ter hoogte van de blootstellingszone (15°C) en de bewaarzone (5°C).

De blootstelling gebeurt in glazen cuvetten.

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

6.2 TESTUITVOERING

Afvalwaterstalen:

De stalen steeds bewaren in het donker ~~bij 4°C e~~ in de koelkast. De testen worden bij voorkeur opgestart binnen 48 h na staalname (ISO 11348), maar een marge tot 4 dagen wordt om praktische redenen getolereerd, op voorwaarde dat het staal correct bewaard wordt. Indien de test pas later kan uitgevoerd worden is het toegelaten het afvalwaterstaal in te vriezen ($\leq -18^{\circ}\text{C}$). Vermeld wel steeds de datums van aankomst en van testuitvoering in het rapport, en de bewaarcondities.

LIMIETTEST

Per experiment heb je nodig:

1 cuvet voor de bacteriesuspensie

3 cuvetten voor elk afvalwaterstaal en 3 voor de controles

Zoutoplossing voor zoetwaterstalen

VERDUNNINGSREEKS

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)
- 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/controler uit de overeenkomstige A cuvetten toe aan de B cuvetten. De finale testconcentraties zijn dus 45 – 22.5 – 11.25 – 5.625 %

100% procedure

Volg de instructies van het eigen testsysteem.

Bacteriesuspensie

Cuvet voor 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 cuvetten voor verdunningsreeks B diluent is aangebracht (standaardprocedure), of - in de 100% procedure – de verdunningen in A, B en C zijn aangemaakt, *of – in de limiettest- alle cuvetten zijn gevuld met de controles en de monsters met zoutaanpassing.*

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 **testoplossingen** met correcte tussenpauzen.

Voor basic test

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

Voor limiettest en 100% procedure

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 $\leq 10\%$. Grotere afwijkingen wijzen op een pipetteerfout waardoor het bacterie-aantal niet gelijk is in iedere cuvet.
- De EC_{50} 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

LIMIETTEST

Tabel 1: gemeten signalen

tijd (min) \ conc. %	0	0	0	gem	90	90	90	gem
0	90	94	91	92	91	89	90	90
5	74	83	76	78	84	77	82	81
15	69	78	72	73	81	73	80	78
30	65	76	70	70	77	69	74	73

Tabel 2: procenten

tijd (min) \ conc. %	0	90
0	100	98
5	100	104
15	100	107
30	100	104

Tabel 3: procent inhibitie

tijd (min) \ conc. %	0	90
0	0	2
5	0	-4
15	0	-7
30	0	-4

Het gemeten signaal wordt genoteerd voor elk tijdstip en elke replica (tabel 1). Het gemiddelde signaal van de 3 replica's wordt berekend en per tijdstip worden de gemiddelde waarden uitgedrukt in procent van de controle op datzelfde tijdstip (tabel 2). De inhibitie wordt berekend voor elk tijdstip door het verschil met de controle te berekenen.

De waarde na 30 minuten wordt gebruikt om de inhibitie te beoordelen.

VERDUNNINGSRREEKS

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. De waarde voor 30 minuten blootstelling wordt gebruikt voor de classificatie van afvalwaters.

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
 - **LIMIETTESTEN:**
 - % effect in de hoogste testconcentratie.
 - Voor afvalwaters is 90% de hoogste testconcentratie. Het afvalwater wordt als acuut toxisch beoordeeld indien het effect $\geq 50\%$ is in deze testconcentratie.

De finale beoordeling van de toxicologische kwaliteit van een afvalwater is gebaseerd op het resultaat van 4 biotesten (microtox (% inhibitie van bioluminescentie na 30 min blootstelling aan 89% afvalwater), algen (% inhibitie van de groeisnelheid na 72 uur blootstelling aan 95% afvalwater), daphnia (% immobiliteit na 48 uur blootstelling aan 100% afvalwater) en forel (% sterfte na 96 uur blootstelling aan 100% afvalwater). Het resultaat van de meest gevoelige test wordt gebruikt om het afvalwater als acuut toxisch te beoordelen.

- **VERDUNNINGSREEKSEN**

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. Enkel de waarde voor 30 minuten wordt gebruikt voor de classificatie van afvalwaters.
- Bespreking van de resultaten en eventuele invloeden door externe factoren/afwijkingen tijdens de test.

~~o Voor afvalwaters: eventueel de interpretatie volgens het Vlaamse beoordelingskader voor afvalwaters*:~~

- ~~* < 1 TE: geen acute toxiciteit~~
- ~~* 1-10 TE: lage acute toxiciteit~~
- ~~* 10-100 TE: acute toxiciteit~~
- ~~* > 100 TE: hoge acute toxiciteit~~

~~Vermeld duidelijk dat het resultaat enkel een beoordeling van de acute toxiciteit van het afvalwater voor *Microtox* inhoudt.~~

~~* De finale beoordeling van de toxicologische kwaliteit van een afvalwater is gebaseerd op het resultaat van 4 biotesten (microtox (inhibitie van bioluminescentie na 30 min blootstelling), algen (effecten op groeisnelheid na 72 uur blootstelling), daphnia (effecten op mobiliteit na 48 uur blootstelling) en forel (sterfte na 96 uur blootstelling)). Het resultaat van de meest gevoelige test wordt gebruikt om het afvalwater finaal te classeren.~~

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.