

## Ecotoxiciteitstest: bacteriële luminescentie-inhibitietest

---

**INHOUD**

|          |   |          |
|----------|---|----------|
| <b>1</b> | <b>TOEPASSINGSGEBIED</b>                                    | <b>3</b> |
| <b>2</b> | <b>PRINCIPE</b>   | <b>3</b> |
| <b>3</b> | <b>OPMERKINGEN</b>  | <b>3</b> |
| <b>4</b> | <b>APPARATUUR EN MATERIAAL</b>                              | <b>4</b> |
| 4.1      | <i>Apparatuur</i>   | 4        |
| 4.2      | <i>Materiaal</i>  | 4        |
| 4.3      | <i>Testorganismen</i>                                       | 4        |
| <b>5</b> | <b>REAGENTIA EN OPLOSSINGEN</b>                             | <b>4</b> |
| 5.1      | <i>Oplossingen (worden samen met de bacteriën geleverd)</i> | 4        |
| 5.2      | <i>Referentieoplossing</i>                                  | 4        |
| 5.3      | <i>Testoplossingen</i>                                      | 4        |
| <b>6</b> | <b>PROCEDURE</b>  | <b>5</b> |
| 6.1      | <i>Blootstellingscondities</i>                              | 5        |
| 6.2      | <i>Testuitvoering</i>                                       | 6        |
| <b>7</b> | <b>KWALITEITSCONTROLE</b>                                   | <b>7</b> |
| <b>8</b> | <b>BEREKENINGEN &amp; RAPPORTERING</b>                      | <b>8</b> |
| 8.1      | <i>Berekeningen</i>   | 8        |
| 8.2      | <i>Rapportage</i>   | 8        |
| <b>9</b> | <b>REFERENTIES</b>  | <b>9</b> |

## 1 TOEPASSINGSGBIED

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.

Voor de beoordeling van afvalwaters wordt de 100% procedure gebruikt (de hoogste afvalwaterconcentratie die in deze opstelling getest wordt is 81.9%).

Deze test heeft tot doel de acute toxiciteit voor het trofische niveau van micro-organismen (reducenten) te meten.

## 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<sub>50</sub> : concentratie waarbij 50 % inhibitie van de lichtsterkte tov de controle wordt waargenomen (uitgedrukt in mg/l of in %)

## 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 fischeri* (NRRL-B-11177).

Bron:

Bv. Microtox<sup>®</sup> 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)  
NaOH pa  
HCl pa  
NaCl zuiver

### 5.2 REFERENTIEOPLOSSING

Fenolstandaard (100 mg/l)

### 5.3 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*<sup>1</sup> worden uitgevoerd.
- **Gekleurde stalen.** Kleurencorrectie uitvoeren (zie hiervoor de handleiding van het eigen systeem)

#### Testconcentraties

Wanneer EC<sub>50</sub> waarde bepaald moet worden, wordt de test op een verdunningsreeks uitgevoerd. In het ideale geval zijn de testconcentraties zodanig gekozen dat de EC<sub>50</sub> waarde bij het aantal standaardverduningen (= 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<sub>50</sub> < 11.25 % wordt het staal verder 1/2 verdund.  
Indien EC<sub>50</sub> > 45 % wordt de zgn. **Basic, 81.9 % procedure** toegepast.
- b) de **Basic, 81.9 % procedure** onmiddellijk worden toegepast. In deze procedure is de hoogste concentratie **81.9%** en worden 4 opeenvolgende verdunningen getest (1/2 verdunningen in diluent). {}

Voor referentiestof: hiervoor wordt de standaardprocedure op fenol uitgevoerd. De EC<sub>50</sub> waarde ligt tussen 13 en 26 mg/l. De testconcentraties worden zodanig gekozen dat de EC<sub>50</sub> waarde tussen concentraties 2 en 3 van de 4 geteste verdunningen ligt.

## 6 PROCEDURE

### 6.1 BLOOTSTELLINGSCONDITIONS

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

<sup>1</sup> Voor procedure: zie handleiding Microtox®.

## 6.2 TESTUITVOERING

Afvalwaterstalen:

Voor bewaring en bewaartermijnen: WAC/I/A/010

{}

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:

- 1 cuvet voor de bacteriesuspensie (5°C)
- 5 cuvetten/monster om de eerste verdunningsreeks (A) in aan te maken
- 5 cuvetten/monster om de finale verdunningen (B) in aanwezigheid van bacteriesuspensie aan te maken
- Voor de *basis 81.9%* procedure is een extra cuvet nodig voor het verdunnen van de bacteriesuspensie.

### Vullen van de cuvetten

{ } In het cuvettenblok op het microtoestel zijn 6 rijen voor het plaatsen van cuvetten aanwezig. Voor elk te testen monster/teststof zijn 2 rijen nodig (hieronder A en B genoemd, maar dat kan dus ook C en D zijn etc..).

**Standaardprocedure** (software: basic test)

#### Verdunningsreeks A:

In de A –rij worden de volgende verdunningen aangemaakt:

- Verdunning 1: 2500 µl staal + 250 µl zoutoplossing (91 %)
- 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 in de B rij 500 µl diluent.

Bereid de bacteriesuspensie zoals hieronder beschreven en voeg aan elke cuvet uit de B-rij 10 µl bacteriesuspensie toe.

Wacht 15 minuten.

Meet in elke cuvet uit de B-rij de lichtsterkte (tijd 0).

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

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

**Basic 81.9% procedure** (software: "Basic 81.9%") .

#### Verdunningsreeks A:

In de A –rij worden de volgende verdunningen aangemaakt:

- Verdunning 1 : 2500 µl staal + 250 µl zoutoplossing (91 %) - verwijder na mengen 750 µl
- 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%) – verwijder na mengen 1000 µl

Controle: 1000 µl diluent

Verdunningsreeks B

Bereid de verdunde bacteriesuspensie zoals hieronder beschreven en voeg aan elke cuvet in rij B 100 µl verdunde bacteriesuspensie toe.

Wacht 15 minuten.

Meet in elke cuvet uit de B-rij de lichtsterkte (tijd 0).

Voeg nu 900 µl uit verdunning/controle uit de overeenkomstige A cuvetten toe aan de B cuvetten. De finale concentraties zijn dan 10.24-20.47-40.9-81.9 %

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

### Bacteriesuspensie

**Cuvet voor bacteriesuspensie:** vul deze cuvet met 1000 µl reconstitutievlloeistof (of volgens de handleiding van het testsysteem). Plaats de cuvet in het voorziene vakje (temperatuur 5°C).

**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.

Neem een ingevroren recipiënt met bacteriën uit de diepvries en voeg zo snel mogelijk na de opening de 1000 µl reconstitutievlloeistof uit de gekoelde cuvet aan de bacteriesuspensie toe. Meng door het recipiënt te zwenken en breng de suspensie opnieuw over in de gekoelde cuvet. Plaats deze in het voorziene vakje. De suspensie is maximaal 3 uur bruikbaar.

Voor de standaardprocedure wordt deze suspensie gebruikt.

Voor de 81.9% procedure wordt 150 µl van de bacteriesuspensie verdund met 1500 µl diluent. Deze verdunde suspensie wordt gebruikt in de test.

### Metingen:

Meet de lichtsterkte in alle testoplossingen met correcte tussenpauzen.

- Meet de basisactiviteit van de bacteriesuspensie (tijdstip 0).
- Voeg onmiddellijk de teststof toe.
- 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 fenol gebruikt waarvan de EC<sub>50</sub>waarde tussen 13 en 26 mg/l moeten liggen bij elk van de tijdstippen.
- De EC<sub>50</sub> waarde moet gebaseerd zijn op interpolatie. Indien de EC<sub>50</sub> 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 in de standaardtest 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

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  $EC_{50}$  waarden voor fenol worden gerapporteerd voor de tijdstippen 5, 15 en 30 minuten, met de 95% betrouwbaarheidsgrenzen.

De inhibitie in de hoogste testconcentratie in de 100% procedure voor 30 minuten blootstelling wordt **gerapporteerd voor** afvalwaters.

### 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,-batch, 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
  - {}
  - Limiettest: % effect **na 30 minuten** in de hoogste testconcentratie in de 100% procedure. (Voor afvalwaters is 81.9% de hoogste testconcentratie. {})
  - VERDUNNINGSGREEKSEN
  - 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:
  - EC<sub>50</sub> waarden voor 5, 15 en 30'. {}.
- Bespreking van {} 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, literatuurgegevens en allerlei nuttig informatie.