

# Ecotoxiciteitstest met bacterie: acute toxiciteit voor de luminescente bacterie (*Aliivibrio fischeri*)

## INHOUD

<b>1</b>	<b>TOEPASSINGSGEBIED</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Principe van de test</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Eindpunt voor acute toxiciteit bij bacterie</i>	3
2.2	<i>Limiettest</i>	3
2.3	<i>Verdunningsreeks</i>	3
<b>3</b>	<b>Definities</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>Acute toxiciteit voor de luminescente bacterie (<i>Aliivibrio fischeri</i>)</b>	<b>4</b>
4.1	<i>Inleiding</i>	4
4.2	<i>Apparatuur en materiaal</i>	5
4.3	<i>Reagentia en oplossingen</i>	5
4.4	<i>Watermonster</i>	5
4.5	<i>Werkwijze</i>	7
4.5.1	Protocol 81.9% basic test voor limiettest en verdunningsreeks	7
4.5.2	Correctie voor kleur en/of turbiditeit	10
4.5.3	Kwaliteitscontrole	10
4.5.4	Rapportering	12
<b>5</b>	<b>REFERENTIES</b>	<b>12</b>
	<b>BIJLAGE A : Methode beschrijving bij gebruik van het Microtox® toestel.</b>	<b>13</b>
	Protocol 81.9% basic test voor limiettest en verdunningsreeks	13

## 1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de werkwijze om de acute toxiciteit voor de zoutwaterbacterie *Allivibrio fischeri* (vroeger ook *Vibrio fischeri* of *Photobacterium fischeri* genoemd) te evalueren. Deze test heeft tot doel de acute toxiciteit voor het trofische niveau van micro-organismen (reducenten) in te schatten.

De procedure is van toepassing voor

- Diverse waterige milieumatrices: afval-, oppervlakte-, drink- en grondwater. Waterige oplossingen met chemische stoffen (zoals voor eerstelijnscontrole), mits deze goed oplosbaar zijn in water, of in oplossing blijven als stabiele suspensie of via dispersie, of met gebruik van een solvent.

Het testorganisme is een mariene, luminescente bacterie. Dit wil zeggen dat bij testen op watermonsters met een geleidbaarheid lager dan 28 mS/cm een correctie zal voorzien worden met toevoeging van een geconcentreerde zoutoplossing.

## 2 PRINCIPE VAN DE TEST

### 2.1 EINDPUNT VOOR ACUTE TOXICITEIT BIJ BACTERIE

De inhibitie van lichtemissie wordt gemeten in een batch cultuur van bacteriën, die blootgesteld wordt aan het water, de hoogst mogelijke concentratie al of niet met verdunningen. Het testorganisme is de mariene bacterie *Allivibrio fischeri*, een bioluminescentie bacterie. De sterkte van het luminescent signaal is een maat voor de fysiologische en metabole activiteit van de bacterie populatie. De verandering van luminescentie door toxiciteit van het watermonster wordt gemeten na een bepaalde contacttijd (30 minuten<sup>1</sup>) aan het teststaal, en het % effect wordt gecorrigeerd ten opzichte van de verandering (= spontane daling) van het luminescentie signaal in de controle (of blanco).

### 2.2 LIMIETTEST

Voor het meten van de toxiciteit van waters wordt standaard een limiettest uitgevoerd op de hoogst mogelijke concentratie van het watermonster. Het % effect na 30 minuten blootstelling aan de hoogst geteste concentratie van het watermonster wordt gerapporteerd, en dit als % effect relatief t.o.v. controle medium.

### 2.3 VERDUNNINGSREEKS

Uitzonderlijk worden de testen uitgevoerd op een verdunningsreeks van het water. Dit kan van toepassing zijn wanneer dit vereist is in het kader van de bijzondere voorwaarde in een vergunning

---

<sup>1</sup> Metingen kunnen ook na 5' en 15' uitgevoerd worden, maar niet vereist voor rapportage van resultaat acute toxiciteit. Additionele aflezing in overleg met de klant.

of bij verder onderzoek naar oorzaken van acute toxiciteit (TIE-Toxiciteit identificatie & evaluatie). Ook bij het testen van een referentiestof, als deel van kwaliteitscontrole, zal de bacterietest in een verdunningsreeks opgezet worden. Daarbij wordt het watermonster (of de referentiestof) in een reeks van minstens 4 concentraties getest, naast de controle conditie. De concentratiereeks (# concentraties, en verdunningsfactor) van het water of de referentiestof wordt zodanig gekozen dat de hoogste concentratie ongeveer 100% effect oplevert, en de laagste concentratie 0% effect (of niet significant verschillend van de controle). Dit laat toe een grafiek met concentratie-effect te genereren, alsook een EC<sub>50</sub>-waarde te berekenen die de concentratie van het water of referentiestof geeft waarbij 50% van de testorganismen acute toxiciteit ondervinden. Bij deze test met een verdunningsreeks kan eveneens het % effect, zoals in de limiettest, bepaald worden voor het water met de hoogste testconcentratie van de reeks.

### 3 DEFINITIES

Volgende definities zijn van toepassing:

- EC<sub>50</sub> (50% effect concentratie): dit is de concentratie van een watermonster of teststof waarbij 50 % inhibitie van de lichtsterkte t.o.v. de controle wordt waargenomen.
- Limiettest: in de test wordt 1 concentratie van het water (nl. de hoogst mogelijke concentratie van het water) geëvalueerd in vergelijking met controle medium.
- Randvoorwaarden: voor het testmonster geldende grenzen voor fysicochemische parameters, zoals pH, O<sub>2</sub>, geleidbaarheid waarbij er geen effect op (acute) toxiciteit wordt verwacht ten opzichte van de controle conditie.
- Referentiestof: een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de gevoeligheid van de geteste soort onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate veranderd is en/of de uitvoering van de test voldoet aan vooropgestelde criteria qua te verwachten toxische effecten voor de referentiestof (ook positieve controle).
- Toxiciteit identificatie en evaluatie (TIE): onderzoek naar de oorzaken van toxiciteit door watermonsters te onderwerpen aan diverse behandelingen (filtratie, actieve kool, organische extractie) met het doel de toxiciteit toe te wijzen aan bepaalde fracties uit deze behandelingsstappen.

### 4 ACUTE TOXICITEIT VOOR DE LUMINESCENTE BACTERIE (*ALIIVIBRIO FISCHERI*)

#### 4.1 INLEIDING

Voor deze bacteriële test is de ISO 11348 richtlijn de basis.

Reagentia en gevriesdroogde bacteriën zijn commercieel verkrijgbaar.

Er zijn specifieke toestellen beschikbaar om deze methode uit te voeren, bijv. Microtox® toestel van een gethermostatische reagent en meetcellen (in bijlage A wordt de methode beschreven bij gebruik van het Microtox® toestel).

Gelijkaardige varianten van toestellen voor luminescentie metingen, met gethermostatische incubatiecellen en meetcellen zijn mogelijk **mits voldaan kan worden aan de incubatietemperatuur voor de bacteriën en de monsters, beschreven in de ISO-richtlijn.**

Een correcte testuitvoering vergt uiterste nauwkeurigheid in het pipetteren van kleine volumes: gebruik precisiemateriaal en voer de acties correct uit met geverifieerde pipetten. Repeteerpipetten voor kleine volumes kunnen helpen bij reproduceerbare transfer van bacteriesuspensie.

## 4.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Zuurstofmeter voor bepaling van zuurstof conform WAC/III/A/008
- Thermometer
- pH-meter voor pH meting conform WAC/III/A/005
- Geleidbaarheidsmeter voor meting geleidbaarheid conform WAC/III/A/004
- Materiaal en apparatuur voor de bepaling van ammonium.
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg
- Beluchting systeem (olie-vrij)
- Pipetten en toebehoren
- Repeteerpipet, met bijhorende tips voor kleine volumes (bijv. 10 µl)
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven, maatcilinders voor bereiding van testoplossing referentiestof.
- Recipiënten voor meting van fysicochemische parameters.
- Klok, met chronometer
- Glazen cuvetten, **of geschikte microtiterplaten** voor luminometer
- Luminometer met gethermostatiseerde plaatsen voor cuvetten, nl. (15 ± 1)°C voor meetcuvetten en (5.5 ± 1)°C voor bacteriesuspensie, **of afzonderlijke thermoblock of incubator voor de bacteriën en de testrecipiënten of microtiterplaten.**
- Sommige commerciële toestellen als **Microtox® of Biolight® Toxy hebben** ~~Eventueel met~~ bijhorende software (meetprogramma 's & berekeningen).
- Spectrofotometer

## 4.3 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Gelyofiliseerde bacteriën), bewaren op -20 °C.
- Reconstitutie oplossing (ontdooivloeistof voor de bacteriën), bewaren in koelkast.
- Diluent (verdunningsvloeistof), bewaren in koelkast.
- Osmotic Adjusting Solution (OAS) (22 % NaCl oplossing), bewaren in koelkast.
- **Natriumchloride**
- **Referentiestof, bijv.** Fenolstandaard (100 mg/l), bewaren in koelkast, donkere fles, 6 maanden houdbaar.
- Gedemineraliseerd water (< 10 µS/cm).
- NaOH, 1N en HCl, 1N

## 4.4 WATERMONSTER

Voor de monstername en houdbaarheid wordt verwezen naar respectievelijk WAC/I/A/003, WAC/I/A/004 en WAC/I/A/010.

Bij gebruik voor fysicochemische metingen om de randvoorwaarden te controleren wordt een gehomogeniseerd en representatief deelstaal van het watermonster genomen, en op kamertemperatuur gezet.

Voor start van de test worden de volgende fysicochemische parameters bepaald: geleidbaarheid, pH, zuurstof en ammonium. Voor de meeste van deze parameters zijn er aanvaardbare ranges gedefinieerd waarbij er geen effect in de vorm van acute toxiciteit voor de bacterie zal optreden (Tabel 2, Postma et al. 2002).

**Tabel 1: Randvoorwaarde voor fysicochemische parameters in watermonsters voor bacterie**

Parameter	pH	Zuurstof (mg/l)	Geleidbaarheid ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Ammonium (mg/l $\text{NH}_4^+$ , bij pH 8)
Bacterie, <i>Allivibrio fischeri</i>	6.0 – 8.5	$\geq 3$	28000 - 48000	< 1000

De test wordt uitgevoerd met een mariene bacterie waarvoor een geleidbaarheid van 28000 - 48000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  optimaal is. Daarom zal bij de testuitvoering met waters van zoet – of brakwater kwaliteit met een geleidbaarheid lager dan 28 mS/cm gecorrigeerd worden met zouttoevoeging (via toevoeging van OAS-oplossing, of vast NaCl in het watermonster, zie ook 4.5.1. en wordt vermeld bij rapportage. Indien de geleidbaarheid in het watermonsters de bovengrens voor de bacterie overschrijdt, dan zal in een limiettest het watermonster verdund worden met gedemineraliseerd water tot de geleidbaarheid in het ruwe monster overeenkomt met een geleidbaarheid van 48000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  50% als hoogste concentratie (geen correctie met NaCl) en wordt het % effect bij die concentratie afgelezen. Bij het testen van een verdunningsreeks zal het watermonster zodanig verdund worden dat de hoogste concentratie van de reeks overeenkomt met een geleidbaarheid van 48000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , en van daaruit 1:1 verder verdund worden om een  $\text{EC}_{50}$  af te leiden.

De bacteriën zijn pH gevoelig. Indien de pH in het water afwijkt van de randvoorwaarden (< 6 of > 8.5) dan moet deze bijgesteld worden met HCl, of NaOH tot pH  $7.5 \pm 0.1$ . Dit wordt gerapporteerd.

Bioluminescentie activiteit van de bacteriën hangt af van zuurstof. Indien dit zuurstofgehalte lager is dan 3 mg/l dan wordt het watermonster gedurende 20 min., net voor aanvang van de test, belucht. Deze aanpassing wordt gerapporteerd.

De metingen van ~~chloriden, sulfaten~~ en ammonium worden gerapporteerd. In geval van afwijkende randvoorwaarde voor ammonium wordt er niet gecorrigeerd, maar wordt overschrijding van randvoorwaarde duidelijk vermeld in het rapport, als mogelijke parameter die bijdraagt tot gemeten toxiciteit, naast deze die te wijten zou zijn aan milieugevaarlijke stoffen.

In overleg met de opdrachtgever kan bij afwijking van ammonium alsnog een nieuwe test worden uitgevoerd door aanpassingen te doen aan het water (bijv. beluchten om ammoniak te strippen, of bufferen voor pH om ammonium/ammoniak effect uit te sluiten) gevolgd door meting van ammonium. Dergelijke aanpassingen aan het watermonster moeten gerapporteerd worden als een afwijking op de methode.

Andere factoren, dan hogervermelde randvoorwaarden kunnen interfereren met de meting van acute toxiciteit voor bacterie.

- Gechloreerde stalen, bijv. waterstalen die gecontamineerd werden met chloor zijn per definitie bacterievrij en dus toxisch. Indien er aanwijzing is voor chloortoxiciteit kan in overleg met de opdrachtgever een nieuwe meting worden uitgevoerd na verwijdering van het chloor. Om acute toxiciteit te meten zonder chloor interferentie, kunnen zulke stalen gedechloreerd worden met een natriumthiosulfaatoplossing door het doseren van 0.1 ml van een 1.8% thiosulfaatoplossing per 100ml watermonster. Dit is een afwijking van methode die gerapporteerd moet worden.
- Voor watermonsters met een complexe milieumatrix zoals kleur, aanwezigheid van deeltjes of troebeling kan de meting van bioluminescentie verstoord worden door matrixeffecten. Er wordt voor dat type stalen steeds de correctie methode toegepast (zie 4.5.3). Dit wordt overeenkomstig gerapporteerd.

## 4.5 WERKWIJZE

### Algemeen

Bij elk gebruik van een nieuwe bacteriesuspensie voor de bacterie test moet een test opgezet worden met de positieve controle, **bijv.** fenol (100 mg/l) om de kwaliteit van de bacteriën te controleren. Deze analyse gebeurt in parallel met deze van een watermonster, volgens eenzelfde protocol.

~~In afwachting van evaluatie van een specifiek protocol voor een limiettest (met replica's)<sup>2</sup> worden voorlopig al de watermonsters waarvoor enkel de hoogste concentratie moet getest worden volgens een limiettest opgezet volgens hetzelfde protocol als hetgeen nodig is om~~

**De test met de bacterie wordt opgezet in een verdunningsreeks die toelaat een EC50 af te leiden, en tegelijk zoals bij een limiettest het % effect als inhibitie van bioluminescentie te bepalen testen bij de hoogst mogelijk concentratie van het monster (bijv. 90% of 81.9%). Hiervoor wordt het protocol '81.9% Basic test' gekozen, wat de bepaling van EC<sub>50</sub> toelaat en eveneens een % effect geeft voor de hoogst geteste concentratie, nl. 81.9% watermonster.**

### 4.5.1 ~~PROTOCOL 81.9% BASIC TEST~~ PROTOCOL 81.9% BASIC TEST VOOR LIMIETTEST EN VERDUNNINGSREEKS

Dit protocol laat toe een resultaat te bekomen, als 50% effect voor inhibitie van bioluminescentie van een verdunningsreeks van het watermonster, relatief t.o.v. de spontane daling van de controle (blanco). In belang van kostenefficiëntie wordt enkel afleestijd 30 minuten gekozen. Indien een limiettest moet uitgevoerd worden is het voldoende het % effect bij de hoogst geteste concentratie te rapporteren.

~~Via dit protocol kunnen er 2 monsters gelijktijdig getest worden.~~

#### Testcondities:

- **Het meettoestel en toebehoren (bijv. thermoblok, incubator...) worden tijdig voor de meting opgestart zodat de vereiste temperatuurranges gehandhaafd worden voor incubatie van de bacteriën en de testoplossingen, en voor metingen tijdens de test.**
- **De gevriesdroogde bacteriën moeten na reconstitutie in suspensie gehouden worden bij een temperatuur van 4°C ± 3°C.**
- **De bereide testoplossingen worden in een incubator, of thermoblock op constante temperatuur gehouden bij 15°C ± 1°C**

#### Test parameters:

- **1 controle (of blanco = diluent), minstens 1 replica,**
- **2-Monsters met minstens elk 1 replica<sup>3</sup>, en minstens 4 diluties met dilutie factor 2,**
- **Initiële hoogste concentratie 81.9% of 90%, afhankelijk van geleidbaarheid en toevoeging van OAS of vast NaCl,**
- **Een chronometer wordt gebruikt om exacte en dezelfde incubatie- of meettijden voor de testoplossingen of referentiestof te handhaven,**
- **Zero-time reading (meting van activiteit op tijdstip 0)**
- **Test tijd 30 min<sup>4</sup>**

---

<sup>2</sup> Een protocol 81.9% screening, met mogelijkheid voor testen van replica's (en geen verdunningen) wordt geëvalueerd qua bruikbaarheid voor limiettest als alternatief voor de 81.9% basic test, zoals tot hiertoe voorzien in WAC procedure.

<sup>3</sup> Bij een 1<sup>ste</sup> testreeks met de bacteriesuspensie zal één van de watermonsters de referentiestof, bijv. fenol zijn.

<sup>4</sup> Metingen kunnen ook na 5' en 15' uitgevoerd worden, maar niet vereist voor rapportage van resultaat acute toxiciteit. Additionele aflezing in overleg met de klant kan uitgevoerd worden, met voorkeur voor 15'.

**Testoplossingen:**

- Deze worden bereid met diluent volgens meetprogramma van het gebruikte toestel, of volgens procedure van het labo, mits vooraf aanpassingen zoals pH, de geleidbaarheid ... om te voldoen aan de randvoorwaarde. Deze aanpassingen, met de registratie van de fysico-chemische parameters worden gerapporteerd.
- De verdunde testoplossingen worden in geschikte testrecipiënten (bijv. cuvetten, of microtiterplaat) bereid, en voor de meting op de juiste temperatuur  $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  geïncubeerd.

**Testorganismen:**

- Gevriesdroogde bacteriën (commercieel verkrijgbaar, bewaard bij  $-20^{\circ}\text{C}$ ) worden met gekoelde reconstitutievloeistof in suspensie gebracht, mits goed homogeniseren en vervolgens incubatie bij de juiste temperatuur ( $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , en instructies fabrikant).
- De bacteriën in suspensie kunnen binnen maximum 4 uur na reconstitutie gebruikt worden voor een test, en mits voldaan is aan de geldigheidscriteria van de test (zie 4.5.3.1).
- Voor elke nieuwe suspensie van bacteriën, indien meerdere monsters worden getest, zal in parallel de referentiestof getest worden.

**Testuitvoering:**

- Het gewenste volume van de bacteriesuspensie wordt in de geschikte gethermostatische testrecipiënten gebracht via nauwkeurig pipetteren om op de juiste temperatuur te incuberen en men wacht 5 – 15 min<sup>5</sup>.
- Vervolgens wordt de luminescentie gemeten, als achtergrondmeting voor tijdstip 0 (chronometreer) van de bacteriesuspensie in elk van de testrecipiënten. Het resultaat wordt geregistreerd door het toestel, via computer of manueel als ruwe data genoteerd.
- Meteen daarna worden in steeds dezelfde volgorde, overeenkomstig de meetvolgorde de diluties van de referentiestof of monsters nauwkeurig gepipetteerd bij de bacteriënsuspensie, voor incubatie op  $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en de klok wordt ingesteld voor meting vervolgens op 5', 15' en 30' in het toestel. Deze meetresultaten worden geregistreerd door het toestel, via computer of manueel als ruwe data genoteerd.

**Berekeningen en resultaat:**

- De berekeningen worden uitgevoerd aan de hand van software voorzien bij het meettoestel, of via een rekentemplate van het labo met formules volgens ISO-richtlijn 11348-3.
- De parameters m.b.t. de geldigheidscriteria van de test (zie 4.5.3.1) worden geverifieerd. Indien niet voldaan wordt zal de test herhaald worden, eventueel met een nieuwe suspensie van bacteriën.
- Het resultaat wordt uitgedrukt als het % effect (inhibitie van bioluminescentie) bij de hoogste testconcentratie na 30' afleestijd (limiettest), of als EC50 in % monster met 95% confidentielimiet na 30' afleestijd (verduunningsreeks).

~~(5) Indien deze test wordt uitgevoerd in opvolging van een voorgaande test, en binnen de 3 u van ontdooien van gelyofiliseerde bacteriën, dan kan dezelfde bacteriesuspensie gebruikt worden, zie stap 13-16, en vallen deze stappen (in blauw) in het hierna beschreven uitvoeringsschema weg.~~

**Uitvoering:**

- ~~1. Het toestel wordt opgezet, en wanneer de testblok op temperatuur is verschijnt een groen signaal zodat er gestart kan worden.~~

<sup>5</sup> Volume, type testrecipiënt en incubatietijd tot meting tijdstip 0 zijn constant voor elke 0-meting, maar kunnen beperkt variëren tussen meetinstrumenten, en overeenkomstige methode

2. De te testen watermonsters/referentiestof zijn klaar voor gebruik (op kamertemperatuur, randvoorwaarden geverifieerd, en mogelijke interferenties bijv. kleurcorrectie gepland).
3. Test parameters worden ingesteld, indien software met computer wordt gebruikt.
4. Plaats nieuwe cuvetten in de wells A1-A5 en B1-B5 voor monster 1, C1-C5 en D1-D5 voor watermonster 2, ~~een cuvet in de reagent well (S)~~, en een cuvet in F3 (zie Figuur 1).
5. Breng 1000 µl reconstitutie oplossing in de reagent well.
6. Breng 1500 µl diluent in cuvette F3.
7. Breng telkens 1000 µl diluent in cuvetten in A1-A4, en 1000 µl diluent in cuvetten C1-C4.
8. Breng monster 1 in cuvet A5,
  - Indien geleidbaarheid van het monster < 28000 µS/cm, breng 2.5 ml in cuvet A5, voeg 250 µl OAS toe, meng grondig en verwijder terug 750 µl.
  - Indien geleidbaarheid van het monster ≥ 28000 µS/cm en ≤ 48000 µS/cm, breng 2.0 ml in cuvet A5
  - Indien geleidbaarheid van het monster > 48000 µS/cm, verdun het monster met diluent in een apart recipiënt tot geleidbaarheid 48000 µS/cm, en breng van verdunde monster 2 ml in cuvet A5.
9. ~~Herhaal stap 8:~~ voor monster 2 in cuvet C5.
10. Maak 1:1 seriële dilutie door 1000 µl uit cuvet A5 te transfereren naar cuvet A4, goed mengen met pipet, en transfereer 1000 µl uit A4 naar A3, goed mengen en transfereer 1000 µl uit A3 naar A2, goed mengen, en tot slot verwijder 1000 µl uit A2. In cuvet A1 blijft uitsluitend 1000 µl als blanco.
11. ~~Herhaal stap 10:~~ voor monster 2 in cuvetten C5-C2. In cuvet C1 blijft uitsluitend 1000 µl als blanco.
12. Wacht 5 minuten.
13. ~~Men neemt een tube met gelyofiliseerde bacteriën uit de diepvries (S).~~
14. ~~Schudt de tube zodat het pellet van de bacteriesuspensie op de bodem zakt van de tube (vermijdt opwarming van tube door de handen).~~
15. ~~Neem de cuvet met gekoelde reconstitutie oplossing uit de reagent well, en breng de inhoud bij de tube met de bacteriën. Sluit de tube af, en zwenk de tube een 3-tal keer om de bacteriesuspensie grondig te mengen.~~
16. ~~Breng het geheel over in de cuvet die in de reagent well koud staat, en suspendeer een 10-tal keer met een pipet van 500 µl om te mengen. Deze bacterie suspensie kan maximaal gedurende 3 uur gebruikt worden.~~
17. Breng nu 150 µl van de bacteriesuspensie naar cuvet F3 waarin reeds dilutie oplossing was, en meng door herhaaldelijk te suspenderen met de pipet.
18. Breng 100 µl uit de F3 cuvet met verdund reagent naar elk van de cuvetten B1-B5.
19. ~~Herhaal stap 18:~~ voor cuvetten D1-D5.
20. Wacht 15 minuten.
21. Plaats een cuvet in de READ cell, en druk op set.
22. Meet vervolgens in de READ cell nu elk van de cuvetten B1-B5, (en registreer indien niet gekoppeld met computer), dit is de  $I_0$  of achtergrond meting voor bioluminescentie op tijdstip 0.
23. Pipetteer nu onmiddellijk 900 µl uit elk van de cuvetten A1-A5, en transfereer naar corresponderende wells in onderliggende rij B, dus naar B1-B5, en meng door herhaaldelijk suspenderen met de pipet. Stel de klok in op 30 min.
24. ~~Herhaal stap 22~~ voor de cuvetten D1-D5, voor meting  $I_0$  (en registreer).
25. ~~Herhaal stap 23,~~ voor de transfer van 900 µl uit cuvetten C1-C5 naar D1-D5. Stel nu ook de klok in op 30 min.
26. ~~Na 30 minuten worden de cuvetten B1-B5 gemeten voor bioluminescentie  $I_{30min}$ . De resultaten worden geregistreerd, of via computer connectie opgeslagen voor berekening.~~
27. ~~Herhaal stap 26~~ voor de cuvetten D1-D5.

- ~~28. De meetcuvetten uit de thermoblok worden verwijderd als toxisch afval. De bacteriesuspensie in de REAGENT-well kan gebruikt worden voor een volgende test mits binnen de 3 uur na openen van het flesje uit de diepvries.~~
- ~~29. Het resultaat wordt berekend met beschikbare software met % effect voor elke dilutie, en een EC<sub>50</sub> voor 30 min met 95% confidentie interval en geregistreerd. Voor details over berekeningen wordt verwezen naar de handleiding.~~
- ~~30. De berekening van de EC<sub>50</sub> voor de fenolstandaard (100 mg/l) moet tussen 13 en 26 mg/l liggen.~~

#### 4.5.2 CORRECTIE VOOR KLEUR EN/OF TURBIDITEIT

Voor watermonsters (milieumatrices), waar interferenties door kleur, aanwezigheid van deeltjes of troebeling, het gemeten luminescentie signaal kunnen beïnvloeden bij de bacterie test moet er steeds gecorrigeerd worden.

Hiervoor wordt een spectrofotometrische meting uitgevoerd van het watermonster, bij elke concentratie die getest werd. Indien het watermonster aangepast werd met OAS, dan zal er van dit monster, en de corresponderende verdunningen, een bereiding gemaakt worden voor de spectrofotometrische meting bij 490 nm.

Resultaten van de spectrofotometrische metingen bij elk staal, en verdunning worden geregistreerd voor invoer in rekenprogramma van de **beschikbare Microtox software bij het gebruikte toestel of via eigen rekentemplate.**

~~Men roept de resultaten file op, en kiest 'Test', en vervolgens 'Enter colour correction data'. Voor de achterliggende berekeningen wordt verwezen naar de handleiding Microtox.~~

Een gecorrigeerde % effect waarde voor elke testconcentratie, en indien van toepassing een nieuwe EC<sub>50</sub> waarde worden berekend en gerapporteerd als gecorrigeerde waarde.

#### 4.5.3 KWALITEITSCONTROLE

##### 4.5.3.1 EERSTELIJNSCONTROLE

**Beslissingscriterium voor geldigheid van de test:**

- Een referentiestof wordt voor elke aangemaakte bacteriesuspensie getest om te toetsen of de organismen een normale gevoeligheid vertonen. Als referentiestof wordt **bijv.** fenol gebruikt waarvan de EC<sub>50</sub>waarde tussen 13 en 26 mg/l moet liggen bij de test met een verdunningsreeks voor 30 min. blootstelling.
- De spontane lichtdaling van de blanco, nl. de vermindering van I<sub>0</sub> tot I<sub>30min.</sub> mag maximaal 60% bedragen. Een te snelle lichtafname duidt op een slechte kwaliteit van de bacteriële batch, en dan mag die niet gebruikt worden voor een test.
- De variatie tussen de metingen voor alle testcondities in eenzelfde test, op tijdstip t=0 (controle= achtergrond van alle stalen, I<sub>0</sub>) moet ≤ 10 %. Grotere afwijkingen wijzen op een pipetteerfout waardoor het bacterie-aantal niet gelijk is in iedere cuvet.

Deze waarden van de 3 criteria worden bijgehouden in controle kaarten.

**Herkomst en kwaliteit van testorganismen:**

- De herkomst van de organismen moet getraceerd kunnen worden (batchnummer, datum).

#### 4.5.3.2 TWEDELIJNSCONTROLE

- Een test op een toxisch watermonster<sup>6</sup> wordt in duplo uitgevoerd volgens het protocol voor limiet en verdunningsreeks “81.9% basic test” aan hierna vermelde frequentie.
  - De EC<sub>50</sub> waarden worden geregistreerd in een statistische controlekaart, met het 95% confidentie interval.
  - Duplo waarden voor % effect voor elke testconcentratie mogen onderling niet meer dan 20% verschillen.
  - De minimale frequentie voor test op duplo monsters:
    - Bij wekelijkse uitvoering van de test: driemaandelijks.
    - Bij maandelijkse uitvoering: zesmaandelijks.
    - Bovendien zal ieder van de betrokken uitvoerders minstens 1 maal per jaar een test volgens het gangbare protocol om EC<sub>50</sub> te bepalen en % effect bij hoogste testconcentratie.
- Het laboratorium is verplicht om minstens 1x/maand, in iedere maand waarin minstens één test uitgevoerd wordt, een test in parallel op te zetten van een verdunningsreeks van enerzijds het ruwe monster, en anderzijds het monster met een spike van 1 concentratie van steeds eenzelfde referentiestof (bijv. deze die in ISO-ringtesten worden gebruikt):
  - Men kiest een willekeurig monster<sup>7</sup> dat bij aankomst en na controle van de randvoorwaarden in 2 deelstalen wordt verdeeld.
  - De spike wordt gedoseerd aan steeds dezelfde concentratie die zo dicht mogelijk bij de 50% effect concentratie ligt. Voor de bereiding van de spike moet de verdunning vanuit een stockoplossing in het monster worden toegevoegd aan maximum 5% v/v of lager.
  - De resultaten als % inhibitie bij elke concentratie van het milieumonster, en van het milieumonster met spike worden bijgehouden op een controlekaart en zullen gebruikt worden voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van de methode.

#### 4.5.3.3 DERDELIJNSCONTROLE

Minstens 1x per jaar deelnemen aan een externe ringtest, indien die georganiseerd wordt (bijv. Aquacheck).

#### 4.5.3.4 OPVOLGING VAN AFWIJKINGEN

Indien de EC<sub>50</sub> resultaten, of de % effect waarden van de duplo monsters niet voldoen aan de statistische grenzen, of als één of meer van de geldigheidscriteria bij testuitvoering niet voldoen, dan dient een analyse van de oorzaak en reikwijdte uitgevoerd te worden. Indien hieruit blijkt dat bepaalde resultaten onbetrouwbaar zijn mogen deze niet gerapporteerd worden en dient een nieuwe bemonstering te worden uitgevoerd van de geteste waters. Indien van toepassing dient ook de impact op eerder gerapporteerde resultaten te worden nagegaan.

---

<sup>6</sup> Bij gebrek aan toxische milieumonsters kan een monster aangemaakt worden met toevoeging van een referentiestof (positieve controle voor de bacterietest), bijv. zinksulfaat aan 50 mg/l

<sup>7</sup> Indien voorkennis, dan kiest men bij voorkeur monsters die geen tot lage acute toxiciteit hebben (EC<sub>50</sub> < 50%).

#### 4.5.4 RAPPORTERING

Het testrapport bevat:

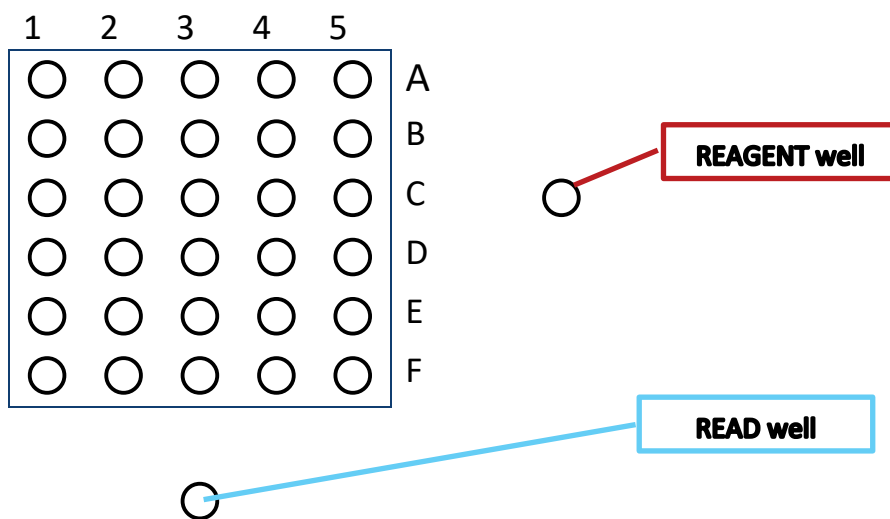
- De identificatie van het watermonster, gegevens over monsternamen, datum van testuitvoering met monster, resultaten van meting van de randvoorwaarden **in het ruwe monster met beschrijving van** aanpassingen, indien van toepassing.
- Verwijzing naar de betreffende WAC-methode voor ecotoxiciteit, en WAC-methode voor bepaling van fysicochemische parameters.
- Gegevens over het testorganisme (naam, herkomst, batch), en protocol van testuitvoering (bijv. met kleurcorrectie)
- Resultaten:
  - Fysicochemische parameters van testoplossing, en eventuele aanpassingen (bijv. toevoeging OAS) **met rapportage van geleidbaarheid**.
  - % effect voor bioluminescentie na 30 min. bij de hoogst geteste concentratie watermonster indien beoordeling volgens limiettest.
  - EC<sub>50</sub> voor bioluminescentie na 30 min en % effect in de hoogst geteste concentratie van het watermonster indien beoordeling op basis van verdunningsreeks
- Opmerkingen en afwijkingen.

## 5 REFERENTIES

- ISO 11348 (2007). Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)—Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
- Microtox Manual. A Toxicity Testing Handbook. Microbics Corporation. Versie 1992. 5 delen.
- MicrotoxOmni™ Software for Windows®, AZUR.
- Postma J.F., De Valk S., Dubbeldam M., Maas J.L., Tonkes M., Schipper C.A. & B. J. Kater (2002). Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicology and environmental safety* 53, 226-237.

**BIJLAGE A : METHODE BESCHRIJVING BIJ GEBRUIK VAN HET MICROTOX® TOESTEL.**

Het Microtox® toestel bestaat uit een gethermostatiseerde testblok op  $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$  voor 30 cuvetten, een gethermostatiseerde cel voor de bewaring van de bacteriën bij  $(5.5 \pm 1)^\circ\text{C}$ , en een gethermostatiseerde meetcel op  $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$  voor 1 cuvet. Het toestel kan onafhankelijk werken, en de meetresultaten voor luminescentie komen op een display om te registreren en apart te verwerken. Het toestel kan eveneens verbonden worden met een computer en de geschikte software (bijv. MicrotoxOmniTM Software), waarbij de meetgegevens meteen verwerkt worden volgens standaard templates. Voor specificaties van toestel en software doet men beroep op de corresponderende handleidingen (bijv. Microtox Manual).



**Figuur 1: Test set up, bijvoorbeeld voor het Microtox toestel.**

**PROTOCOL 81.9% BASIC TEST VOOR LIMIETTEST EN VERDUNNINGSREEKS**

Dit protocol laat toe een resultaat te bekomen, als 50% effect voor inhibitie van bioluminescentie van een verdunningsreeks van het watermonster, relatief t.o.v. de spontane daling van de controle (blanco). In belang van kostenefficiëntie wordt enkel afleestijd 30 minuten gekozen. Indien een limiettest moet uitgevoerd worden is het voldoende het % effect bij de hoogst geteste concentratie te rapporteren.

Via dit protocol kunnen er 2 monsters gelijktijdig getest worden.

Test parameters:

- 1 controle (of blanco), met 1 replica,
- 2 monsters (i.v.t.) met elk 1 replica<sup>8</sup>,
- 4 diluties met dilutie factor 2,
- Initiële concentratie 81.9%
- Test tijd 30 min<sup>9</sup>

<sup>8</sup> Bij een 1<sup>ste</sup> testreeks met de bacteriesuspensie zal één van de watermonsters de referentiestof, fenol zijn.

<sup>9</sup> Metingen kunnen ook na 5' en 15' uitgevoerd worden, maar niet vereist voor rapportage van resultaat acute toxiciteit. Additionele aflezing in overleg met de klant kan uitgevoerd worden, met voorkeur voor 15'.

- Zero-time reading

(§) Indien deze test wordt uitgevoerd in opvolging van een voorgaande test, en binnen de 3 u van ontdooien van gelyofiliseerde bacteriën, dan kan dezelfde bacteriesuspensie gebruikt worden, zie stap 13-16, en vallen deze stappen (in blauw) in het hierna beschreven uitvoeringsschema weg.

Uitvoering:

1. Het toestel wordt opgezet, en wanneer de testblok op temperatuur is verschijnt een groen signaal zodat er gestart kan worden.
2. De te testen watermonsters/referentiestof zijn klaar voor gebruik (op kamertemperatuur, randvoorwaarden geverifieerd, en mogelijke interferenties bijv. kleurcorrectie gepland).
3. Test parameters worden ingesteld, indien software met computer wordt gebruikt.
4. Plaats nieuwe cuvetten in de wells A1-A5 en B1-B5 voor monster 1, C1-C5 en D1-D5 voor watermonster 2, een cuvet in de reagent well (§), en een cuvet in F3 (zie Figuur 1).
5. Breng 1000 µl reconstitutie oplossing in de reagent well.
6. Breng 1500 µl diluent in cuvette F3.
7. Breng telkens 1000 µl diluent in cuvetten in A1-A4, en 1000 µl diluent in cuvetten C1-C4.
8. Breng monster 1 in cuvet A5,
  - Indien geleidbaarheid van het monster < 28000 µS/cm, breng 2.5 ml in cuvet A5, voeg 250 µl OAS toe, meng grondig en verwijder terug 750 µl.
  - Indien geleidbaarheid van het monster ≥ 28000 µS/cm en ≤ 48000µS/cm, breng 2.0 ml in cuvet A5
  - Indien geleidbaarheid van het monster > 48000 µS/cm, verdun het monster met diluent in een apart recipiënt tot geleidbaarheid 48000 µS/cm, en breng van verdunde monster 2 ml in cuvet A5.
9. Herhaal stap 8: voor monster 2 in cuvet C5.
10. Maak 1:1 seriële dilutie door 1000 µl uit cuvet A5 te transfereren naar cuvet A4, goed mengen met pipet, en transfereer 1000 µl uit A4 naar A3, goed mengen en transfereer 1000 µl uit A3 naar A2, goed mengen, en tot slot verwijder 1000 µl uit A2. In cuvet A1 blijft uitsluitend 1000 µl als blanco.
11. Herhaal stap 10: voor monster 2 in cuvetten C5-C2. In cuvet C1 blijft uitsluitend 1000 µl als blanco.
12. Wacht 5 minuten.
13. Men neemt een tube met gelyofiliseerde bacteriën uit de diepvries (§).
14. Schudt de tube zodat het pellet van de bacteriesuspensie op de bodem zakt van de tube (vermijdt opwarming van tube door de handen).
15. Neem de cuvet met gekoelde reconstitutie oplossing uit de reagent well, en breng de inhoud bij de tube met de bacteriën. Sluit de tube af, en zwenk de tube een 3-tal keer om de bacteriesuspensie grondig te mengen.
16. Breng het geheel over in de cuvet die in de reagent well koud staat, en suspendeer een 10-tal keer met een pipet van 500 µl om te mengen. Deze bacterie suspensie kan maximaal gedurende 3 uur gebruikt worden.
17. Breng nu 150 µl van de bacteriesuspensie naar cuvet F3 waarin reeds dilutie oplossing was, en meng door herhaaldelijk te suspenderen met de pipet.
18. Breng 100 µl uit de F3 cuvet met verdund reagent naar elk van de cuvetten B1-B5.
19. Herhaal stap 18: voor cuvetten D1-D5.
20. Wacht 15 minuten.
21. Plaats een cuvet in de READ cell, en druk op set.
22. Meet vervolgens in de READ cell nu elk van de cuvetten B1-B5, (en registreer indien niet gekoppeld met computer), dit is de I<sub>0</sub> of achtergrond meting voor bioluminescentie op tijdstip 0.

23. Pipetteer nu onmiddellijk 900 µl uit elk van de cuvetten A1-A5, en transfereer naar corresponderende wells in onderliggende rij B, dus naar B1-B5, en meng door herhaaldelijk suspenderen met de pipet. Stel de klok in op 30 min.
24. Herhaal stap 22 voor de cuvetten D1-D5, voor meting I0 (en registreer).
25. Herhaal stap 23, voor de transfer van 900 µl uit cuvetten C1-C5 naar D1-D5. Stel nu ook de klok in op 30 min.
26. Na 30 minuten worden de cuvetten B1-B5 gemeten voor bioluminescentie  $I_{30\text{min}}$ . De resultaten worden geregistreerd, of via computer connectie opgeslagen voor berekening.
27. Herhaal stap 26 voor de cuvetten D1-D5.
28. De meetcuvetten uit de thermoblok worden verwijderd als toxisch afval. De bacteriesuspensie in de REAGENT-well kan gebruikt worden voor een volgende test mits binnen de 3 uur na openen van het flesje uit de diepvries.
29. Het resultaat wordt berekend met beschikbare software met % effect voor elke dilutie, en een  $EC_{50}$  voor 30 min met 95% confidentie interval en geregistreerd. Voor details over berekeningen wordt verwezen naar de handleiding.
30. De berekening van de  $EC_{50}$  voor de fenolstandaard (100 mg/l) moet tussen 13 en 26 mg/l liggen.