

Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von Photobacterium phosphoreum - Leuchtbakterien-Abwassertest Erweiterung des Verfahrens DIN 38 412 - L 34 (DIN 38 412 - L 341)

1 Arbeitsgrundlagen

- DIN 38 402 - A11; Probenahme von Abwasser (Dezember 1995)
- DIN 38 402 - A30; Vorbehandlung, Homogenisierung und Teilung heterogener Wasserproben (Juni 1998)
- DEV L 1; Allgemeine Hinweise zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer Testverfahren (37. Lieferung 1997)
- DIN EN 72027 Bestimmung der Trübung (März 1994)
- DIN 38 412 - L34; Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von Photobacterium phosphoreum - Leuchtbakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien (Juli 1997)
- DIN 38 412 - L341; Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von Photobacterium phosphoreum - Leuchtbakterien-Abwassertest, Erweiterung des Verfahrens DIN 38 412 - L 34 (L 341) (Oktober 1993, 30. Lief. 1994 und Berichtigungsblatt für S. 5/6 der 32. Lief. 1995)
- AQS-Merkblätter
für die Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung
Herausgegeben von der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA)
Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., Berlin 1991

Weitere Literatur siehe Abschnitt 11

2 Zweck

Das vorliegende Merkblatt enthält Ergänzungen und Hinweise für die praktische Durchführung des Tests zur Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von frisch gezüchteten oder flüssiggetrockneten Leuchtbakterien (*Vibrio fischeri* NRRL B-11177, ehemals als *Photobacterium phosphoreum* bezeichnet). Es legt außerdem verbindliche Maßnahmen zur analytischen Qualitätssicherung (AQS) und analytischen Qualitätskontrolle fest.

Anmerkung 1: *Der Test ist in erster Linie für behandelte (gereinigte) Abwässer geeignet. Bei Rohabwässern mit hoher organischer Belastung kann eine nährstoffbedingte Verminderung der Biolumineszenz auftreten; derartige Effekte sind mit Vorsicht zu interpretieren. (vgl. Grabert, E. & F. Kössler). Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist jedoch zu berücksichtigen, daß derartige Stoffe im Abwasser bei der Herstellung der Testansätze mit verdünnt werden*

3 Probenahme

Für die Probenahme und den Transport sollten Gefäße aus Glas verwendet werden. Müssen die Proben eingefroren werden, können Gefäße aus Polypropylen oder Polyethylen eingesetzt werden.

4 Probenkonservierung

Die nach Abschnitt 3 erhaltene Probe soll möglichst bald nach der Entnahme getestet werden. Eine Konservierung darf nur durch Kühlen der Probe (0 - 5 °C) für weniger als 2 Tage im Dunkeln erfolgen. Ist eine längere Probenaufbewahrung nicht zu vermeiden, kann die Probe bei ≤ -18 °C bis zu 2 Monate tiefgefroren werden. Glasgefäße können, bis zur Hälfte gefüllt, in schräger Lage eingefroren werden. Es kann sinnvoll sein, die Probe nach Homogenisierung (s. Abschnitt 5) in Teilproben tiefzuzufrieren. Konservierungsmaßnahmen sind zu dokumentieren.

5 Probenvorbehandlung

- Tiefgefrorene Proben müssen vor der Weiterverarbeitung unbedingt vollständig aufgetaut werden, da Konzentrierungseffekte im Innern der Probe auftreten. Das Auftauen tiefgefrorener Proben kann z.B. in einem maximal 40 °C warmen Wasserbad erfolgen. Gelegentliches sanftes Schütteln der Probe wird empfohlen.
- Die Probe wird nach DIN 38 402 - A30 homogenisiert.
- Der pH-Wert des Abwassers vor Testbeginn wird dokumentiert.
- Sind im Abwasser störende ungelöste Stoffe (grobe Bestandteile) enthalten, bleibt die Probe 1 Stunde stehen. Das überstehende Wasser wird für den Test verwendet.
- Die Probe wird nur mit festem NaCl aufgesalzen. Hyperosmotische Effekte durch die Aufsalzung sind zu vermeiden. Durch eine Leitfähigkeitsmessung vor der Aufsalzung ist zu ermitteln, ob die Probe einen erhöhten Elektrolytgehalt aufweist. Die Leitfähigkeit ist jedoch kein unmittelbares Maß für den osmotischen Druck. Sie kann daher nur Richtwerte liefern. Deshalb empfiehlt sich die osmometrische Messung und Korrektur der Probe.

Häufig genügt folgende Vorgehensweise:

Nach DIN 38412 - L34, Abschnitt 5 unterbleibt die Aufsalzung, wenn die Salzkonzentration 20 g/l NaCl-Äquivalente übersteigt. Dies entspricht einer Leitfähigkeit von 35 mS/cm.

Wenn der Salzgehalt der Probe 50 g/l NaCl-Äquivalente (entspricht ca. 70 mS/cm) übersteigt, wird in den Verdünnungsstufen $G \leq 2$ der Salzgehalt in den Verdünnungsstufen 35 g/l NaCl-Äquivalente überschritten. Bei $G = 1$ tritt ein hyperosmotischer Effekt ab 39 g/l NaCl-Äquivalente (entspricht ca. 60 mS/cm) auf.

Um die maximal verträgliche Salzkonzentration von 50 g/l NaCl-Äquivalente bei sehr stark salzhaltigen Proben im Verdünnungsansatz bei $G > 2$ rasch zu unterschreiten, wird empfohlen, für die ersten ein bis zwei Verdünnungsschritte destilliertes Wasser anstelle einer 2 %igen NaCl-Lösung zu verwenden.

Die resultierende Testansatzkonzentration darf die Osmolarität einer NaCl-Lösung von 35 g/l NaCl nicht überschreiten.

6 Geräte

- Die Einstellungen beim Gebrauch der zur Anzucht und zur Aufbewahrung der Leuchtbakterien sowie zum Test verwendeten Geräte sind zu dokumentieren.
- Die Küvetten vor Gebrauch sorgfältig auf Reinheit und Materialfehler (Risse, Bläschen) kontrollieren.
- Küvetten verschiedener Hersteller dürfen nicht gemischt werden.
- Wenn Küvetten gespült werden, ist auf besonders sorgfältiges Nachspülen mit deionisiertem Wasser zu achten. Gespülte Küvetten dürfen nicht mit neuen Küvetten gemischt werden.
- Die Einhaltung der Inkubationstemperatur von $15 \pm 0,2$ °C ist in regelmäßigen Abständen zu überprüfen und zu dokumentieren.
- Die Gleichwertigkeit der Stellplätze im Thermoblock ist in einem Versuch zu überprüfen, in dem nur Kontrollansätze getestet werden.

- Wenn mehrere Inkubatoren gleichzeitig für Tests verwendet werden, müssen in jedem Inkubator parallel zu den Testansätzen Kontrollansätze mitgeführt werden.
- Um gravierende Leuchtkraftunterschiede der Bakterienpräparate und -chargen erkennen zu können, ist es erforderlich, die absolute Leuchtintensität der Ansätze zu messen. Bei Geräten, die die Leuchtintensität der Kontrollansätze automatisch auf den Wert 100 setzen und I_0 -Werte nur prozentual zu den Kontrollen ausgeben, empfiehlt sich eine Nachrüstung der Geräte.

7 Testbakterien

Anmerkung 2: *Die Testdurchführung mit frischgezüchteten Bakterien sollte nur in Laboratorien erfolgen, die über entsprechende Ausrüstungen und Erfahrungen für steriles Arbeiten mit Mikroorganismen verfügen.*

7.1 Stammhaltung

- Der vorgeschriebene Leuchtbakterienstamm ist unter der Nr. 7151 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), 38124 Braunschweig, Mascheroder Weg 1b hinterlegt.
- Bei dem Bakterienstamm handelt es sich um Bakterien der Risikogruppe 1 (kein Risiko für Personal beim Umgang mit diesen Bakterien). Zum Schutz des Bakterienstammes vor Fremdinfektion müssen jedoch grundsätzliche Arbeitsregeln der Mikrobiologie, besonders in Bezug auf Ausstattung der Laborräume und des Arbeitsplatzes, sowie des sterilen Arbeitens im Umgang mit dem Bakterienstamm (Stammhaltung, Isolierung, Kultivierung, Überprüfung der Reinkultur etc.) beachtet werden (Literaturhinweise s. 11.).
- Bei der Beschaffung der Bakterienpräparate ist darauf zu achten, daß die Kühlkette nicht unterbrochen wird. Gleiches gilt für die Lagerung der Bakterien im Labor.

Anmerkung 3: *Bei der Bestellung von Bakterien bei der DSMZ kann es u.U. im Sommer zu Problemen kommen, da die Bakterien auf Schrägagar ungekühlt verschickt werden.*

- Mehrfach fraktionierte Ausstriche sind für die Gewinnung einer Reinkultur leuchtender Bakterien notwendig.

7.2 Testkulturen

- Die Herkunft der Leuchtbakterien sowie bei Verwendung flüssiggetrockneter Bakterien Präparatenamen, Chargennummer sowie das Bezugs- und Verfallsdatum und die Lagerungsbedingungen sind anzugeben.
- Der Hersteller bzw. Vertreiber sowie die Charge und das Bezugsdatum des verwendeten Rinderserumalbumins, des Casein-Peptons und des Hefeextraktes sind aufgrund der Anmerkung in der Norm
- (Abschnitt 6.1 und 6.3) anzugeben.
- Bewährt haben sich Bacto-Pepton (0118) und Hefeextrakt (0127) der Fa. DIFCO, Augsburg, sowie Rinderserumalbumin der Fa. Sigma (A - 2153).

Anmerkung 4: *Es hat sich bewährt, die Platten nicht länger als 3 Tage (z.B. von Freitag bis Montag) zu inkubieren, wenn sie für Anzuchten (Flüssigkultur) verwendet werden sollen.*

- Für die nach 7.2 und 7.3 der Norm geforderte Trübungsmessung ist die DIN EN 72027 zu beachten.
- Es ist unbedingt darauf zu achten, daß das Schutzmedium vorgekühlt ist.
- Bei Passagen zwischen Vor- und Hauptkultur sollten Temperatursprünge zwischen den Medien vermieden werden.

Anmerkung 5: *In der Norm DIN 38 412 - L341, Ausgabe Oktober 1993 wurde bei der 32. Nachlieferung der DEV in Abschnitt 7.4, Anmerkung 1 die dort genannte Natriumhydroxid-Lösung in Natriumchlorid-Lösung geändert.*

8 Testdurchführung

- Der Zeitpunkt des Auftauens flüssiggetrockneter oder gefrorener Bakterien (s. Abschnitt 7.5 der Norm) ist zu dokumentieren.
- Der Zeitpunkt des Testbeginns ist zu dokumentieren.
- Die Angleichzeit nach Herstellung der Testsuspensionen muß mindestens 15 Minuten betragen und sollte 30 Minuten nicht überschreiten.
- Wenn bei gefärbten Proben in den beiden den G_L -Wert bestimmenden Verdünnungsstufen noch eine farbbedingte Beeinflussung des Meßergebnisses möglich erscheint, ist eine Farbkorrektur, z.B. mit speziellen Farbkorrekturküvetten (s. Abschnitt 11), durchzuführen.

9 Gültigkeitskriterien

9.1 Referenzsubstanzen

- Bei jeder gelieferten Bakteriencharge sind Testansätze mit 3 Referenzsubstanzen zu testen.
- Zusätzlich ist parallel zu jedem Test mindestens eine der drei Referenzsubstanzen mit zu testen:
Für Referenzansätze mit jeweils einer Konzentration (Endkonzentration im Test) von
 - 25 mg/l Zn^{2+} als Zinksulfat Heptahydrat ($ZnSO_4 \times 7 H_2O$, p.A.),
 - oder 6 mg/l 3,5-Dichlorphenol ($C_6H_4OCl_2$, p.A.),
 - oder 4 mg/l Cr(VI) als Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$, p.A.)(Lösungen nicht neutralisiert; einzeln prüfen)

muß die Hemmung der Lichtemission nach 30 Minuten Kontaktzeit zwischen 20% und 80% liegen.

Es wird empfohlen, die Stammsätze der Referenzsubstanz-Lösungen mit Titerlösungen herzustellen.

9.2 Weitere Anforderungen

Der f_K -Wert muß mindestens den Wert 0,6 erreichen und darf den Wert 1,8 nicht übersteigen.

Die Abweichungen der Parallelbestimmungen von ihrem Mittelwert dürfen sowohl bei den Kontrollansätzen als auch bei den den G_L -Wert bestimmenden Testansätzen (letzte Verdünnungsstufe mit Hemmungen $\geq 20\%$ und erste Verdünnungsstufe mit Hemmungen $< 20\%$) nicht mehr als 3% bzw. 3 Prozentpunkte betragen. (Beispiel für nicht erfülltes Gültigkeitskriterium: s. Anhang)

Anmerkung 6: *Bei hohen Raumtemperaturen können deutliche Temperaturunterschiede zwischen einzelnen Stellplätzen im Thermoblock auftreten.
Wenn das Gültigkeitskriterium "Abweichung der Parallelbestimmungen von ihrem Mittelwert" mehr als 3% bzw. 3 Prozentpunkte beträgt, dann sollte zunächst die Temperatur im Thermoblock überprüft werden.*

10 Dokumentation

Zur Dokumentation der Testdurchführung ist ein entsprechendes Testprotokoll (z.B. Musterprotokoll, s. S. 7 u. 8) anzufertigen.

11 Literatur

- [1] Beckman Instructions 015-555879 = Beckman Microtox System Operating Manual, 1982.
- [2] Birkenbeil, H.
Einführung in die praktische Mikrobiologie.
Laborbücher Biologie, Diesterweg-Salle-Sauerländer, Frankfurt/M und Aarau. (1983)
- [3] Fries, R.
Qualitätssicherung im bakteriologischen Labor.
Enke Verlag, Stuttgart 1995.
- [4] Grabert, E.
Korrektur der absorptiven Hemmung im Leuchtbakterientest durch ein kombiniertes luminometrisches/photometrisches Verfahren.
Technische Universität Berlin; Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung, Heft 8;
"Neue Anwendungen der Lumineszenz in der wirkungsbezogenen Analytik", Berlin 1997, S.37-44
- [5] Grabert, E. & F. Kössler:
About the effect of nutrients on the luminescent bacteria test.
9th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence;
Proceedings Volume Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons.
Eds.: Hastings, J.W., L.J. Kricka, P.E. Stanleg (in press).
- [6] ISO 11348-3
"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.
- [7] Klein, B.
Die Rolle des Kaliums bei Toxizitätstests mit Leuchtbakterien.
Zeitschrift für angewandte Zoologie, 79. Jg. (1992/1993), Heft 2, S. 199-219.
- [8] Klein, B.
Möglichkeiten und Grenzen der Farbkorrektur im Leuchtbakterientest mit Hilfe von Absorptions-Korrektur-Küvetten.
Z. Wasser-Abwasser-Forsch. 23 (1990), 70-74.
- [9] Microbics 113: Microtox absorbance correction procedure.-
Microtox Application Note M 113, (1989)
Microbics Corporation, Carlsbad, California, U.S.A.:1-2.

Anhang

Beispiel für eine Nicht-Erfüllung der Gültigkeitskriterien bezüglich der zulässigen Abweichungen (3% bzw. 3 Prozentpunkte) der Parallelansätze.

Kontrollansätze								
Ansätze	Meßwerte			\bar{f}_{K30}	Gültigkeitskontrolle		erfüllt ?	
	l_0	l_{K30}	l_{K30}/l_0		Abweichung vom Mittelwert $f_{K30} (%)^1$			
50%	295	265	0,8983	0,8508	5,6			
	305	245	0,8033					
Testansätze								
Ansätze	G-Wert	Meßwerte			$H_{30} \%$	$\bar{H}_{30} \%$	Gültigkeitskontrolle	
		l_0	l_{T30}	l_{C30}			Abweichung vom Mittelwert in %-Punkten ²⁾	erfüllt ?
50%								
3	2	292	195	248,4	21,5	25,1	3,6	
4		285	173	242,5	28,7			
5	3	303	228	257,8	11,6	7,55	4,1	
6		302	248	256,9	3,5			
<p>1) Die <u>prozentuale Abweichung</u> der f_{K30}-Werte der Parallelansätze von ihrem Mittelwert $((\bar{f}_{K30} - l_{K30}/l_0) / \bar{f}_{K30}) \cdot 100$ ist ein Maß für die Schwankungsbreite der Kontrollansätze.</p> <p>2) Die <u>Abweichung</u> der H_{30}-Werte der Parallelansätze in Prozentpunkten von ihrem Mittelwert $(\bar{H}_{30} - H_{30})$ ist ein Maß für die Schwankungsbreite der Testansätze.</p>								

TESTPROTOKOLL (Mindestangaben)

LEUCHTBAKTERIENTEST nach DIN 38 412 - L341

(mit frisch gezüchteten oder flüssiggetrockneten Bakterien)

Untersuchungsstelle

Angaben zur Probe:	
Probenahmestelle:	
Probenehmer:	Proben-Nummer:
Probenahme-Datum:	Probenahme-Uhrzeit:
Sonstige Angaben zur Probe (z.B. pH, Leitfähigkeit Geruch, Trübung, Färbung, Osmolarität):	

Probenvorbereitung:			
Konservierung der Probe:			pH-Wert:
keine	gekühlt	eingefroren am:	aufgetaut am:
pH-Einstellung auf:		pH-Einstellung mit:	
Homogenisierung der Probe durch:			Abgesetzt: <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja
Aufsatzung:	<input type="checkbox"/> 20 g/l NaCl		
andere Verfahren:			

Leuchtbakterien(präparat):		
Bezugsquelle:		Bezugsdatum:
Präparatenamen:		Chargennummer:
		Verfallsdatum:
Aufbewahrungstemperatur im Gefrierschrank:		
Überprüfung der Bakteriencharge mit 3 Referenzsubstanzen am:		
Herstellung der Vorkultur:	Herstellung der Hauptkultur (Ernte):	TE/F (=FNU)
Datum:	Datum/Uhrzeit:	
Aufbewahrungstemperatur und -dauer im Gefrierschrank:		

Inkubator-Check:
Parameter, ggf. Geräteeinstellungen:
Letzte Überprüfung der Testtemperatur im Inkubator am :

Referenzsubstanzen im Test:		
Zinksulfat-heptahydrat	3,5-Dichlorphenol	Kaliumdichromat
(Titer)lösung:	(Titer)lösung:	(Titer)lösung:
Konzentration (mg/l):	Konzentration (mg/l):	Konzentration (mg/l):
Ansatzdatum:	Ansatzdatum:	Ansatzdatum:
Zwischenverdünnung (mg/l):	Zwischenverdünnung (mg/l)	Zwischenverdünnung (mg/l)
Datum:	Datum:	Datum:

Handzeichen: _____

LEUCHTBAKTERIENTEST nach DIN 38 412 - L341
(mit frisch gezüchteten oder flüssiggetrockneten Bakterien)

Testdurchführung:

ggf. Datum und Zeitpunkt des Auftauens der Bakterien: _____

Testbeginn (I_0 -Messung): Uhrzeit: _____

Kontrollansätze								
Ansätze	Meßwerte			\bar{f}_{K30}	Gültigkeitskontrolle			
	I_0	I_{K30}	I_{K30}/I_0		Abweichung vom Mittelwert $f_{K30} (%)^{1)}$	erfüllt ?		
80%								
50%								
Testansätze								
Ansätze	G-Wert	Meßwerte			$H_{30} \%$	$\bar{H}_{30} \%$	Gültigkeitskontrolle	
		I_0	I_{T30}	I_{C30}			Abweichung vom Mittelwert in %-Punkten ²⁾	erfüllt ?
80%								
1	1							
2								
50%								
3	2							
4								
5	3							
6								
Referenzansätze (Endkonzentration im Test)								
Zn ²⁺ 25 mg/l								
3,5-DCP 6 mg/l								
Cr(IV) 4 mg/l								
1) Volumen der Testsuspension: 0,2 oder 0,5 ml								
2) Volumen des Testansatzes: 1 ml								

Gültigkeitskriterien (nach 9.1 und 9.2) erfüllt: ja nein

Bemerkungen: _____

Ergebnis: $G_L =$

- frisch gezüchtete Bakterien
- fr. gez. tiefgefrorene Bakterien
- flüssiggetrocknete Bakterien

Datum / Unterschrift