

## Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen (DIN 38 412 - L30)

### 1 Arbeitsgrundlagen

- DIN 38 402- A11; Probenahme von Abwasser (Dezember 1995)
- DIN 38 402- A30; Vorbehandlung, Homogenisierung und Teilung heterogener Wasserproben (Juli 1998)
- DIN EN ISO 5667-16; Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren (Februar 1999)
- DIN 38 412- L11; Bestimmung der Wirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Kleinkrebse (Daphnien-Kurzzeittest) (Oktober 1982)
- DIN 38 412- L30; Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen (März 1989)
- AQS-Merkblätter  
für die Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung  
Herausgegeben von der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA)  
Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., Berlin 1991

### 2 Zweck

Zur Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien ist nach o.g. Norm zu verfahren. Das vorliegende Merkblatt enthält Ergänzungen und Hinweise für die praktische Durchführung. Es legt außerdem verbindliche Maßnahmen zur analytischen Qualitätssicherung (AQS) und analytischen Qualitätskontrolle (AQK) fest.

### 3 Zucht von *Daphnia magna* STRAUS

- Herkunft bzw. Bezugsquelle der Daphnien sind anzugeben (Zuchtprotokoll Seite 7).
- Bei der Neubeschaffung von Daphnien sind die Muttertiere mindestens 1 Woche im eigenen Labor zu hältern.  
Es empfiehlt sich, frühestens die F<sub>2</sub>-Generation für die Testung einzusetzen.
- Es ist anzugeben, welches Wasser als Zuchtwasser verwendet wird.  
Das synthetische Verdünnungswasser (Punkt 9.2.2 der Norm) kann nicht als Zuchtwasser empfohlen werden, da bei seiner Verwendung Mangelkrankheiten auftreten können.  
Empfohlen wird das Medium M4 (nach Elendt-Schneider), das zusätzlich Vitamine und Spurenelemente enthält und dessen Zubereitung im Anhang beschrieben ist.  
Wird Trinkwasser als Zuchtwasser eingesetzt, so ist von Zeit zu Zeit zu bestätigen, dass die Konzentration an Calcium- und Magnesium-Ionen sowie die Verhältnisse von Calcium- zu Magnesium-Ionen und Natrium- zu Kalium-Ionen in den Bereichen liegen, die in der DIN 38 412 - L 30 gefordert werden (Kontrollkarte).  
Die geforderte Chlorfreiheit bei Trinkwasser und die Sauerstoffsättigung des Zuchtwassers werden durch intensive Belüftung erreicht. Es ist darauf zu achten, dass die Luft schadstofffrei ist.
- Ein Hell-Dunkel-Zyklus von 16:8 Stunden wird empfohlen.
- Die Art des Futters ist anzugeben. Vorzugsweise sollte die Fütterung mit frischkultivierten, einzelligen Grünalgen erfolgen. Es sollte soviel gefüttert werden, wie innerhalb eines Tages gefressen werden kann (vor dem Wochenende größere Mengen).

- Die Einhaltung der Hälterungstemperatur von  $20 \pm 2$  °C ist zu überprüfen und zu dokumentieren. Erfahrungsgemäß ist die Temperaturkonstanz des Zuchtwassers bei entsprechender Raumklimatisierung gewährleistet. In der Regel ist die Kontrolle in einem geeigneten Referenzgefäß hinreichend. Zur Kontrolle können Minimum-Maximum-Thermometer verwendet werden. Dann genügt die Angabe der Minimum- und der Maximum-Temperatur.
- Bei der Zucht ist auf kontaminationsfreie Raumluft zu achten.
- Bei Verwendung von Trinkwasser hat sich der Einsatz von Selektiv-Ionenaustauschern (Schwermetall-Eliminierung) und Aktivkohlefiltern zur Vermeidung von Kontaminationen durch Metalle und organische Stoffe bewährt.
- Die Bedingungen der Hälterung und ggf. auftretende Probleme (z.B. Krankheiten, Dauereier, Männchen) sind zu dokumentieren.

**Anmerkung 1:** *Weibchen mit Dauereiern und Männchen sind aus der Zucht zu entfernen, um den beschafften Daphnienklon zu bewahren.*

#### 4 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.

#### 5 Probenkonservierung

Die nach Pkt. 4 erhaltene Probe soll möglichst bald nach der Entnahme getestet werden. Eine Konservierung darf nur durch Kühlen ( $2 - 4$  °C für weniger als 2 Tage) oder Tiefgefrieren ( $\leq -18$  °C, für weniger als 2 Monate) der Probe erfolgen. Es kann sinnvoll sein, die Probe nach Homogenisierung (siehe 6.) in Teilproben abzufüllen und die Teilproben tiefzugefrieren, wenn erst nach Vorliegen des Testergebnisses weitere Verdünnungsstufen getestet werden. Weitere Hinweise zur Probenkonservierung siehe DIN EN ISO 5667-16. Konservierungsmaßnahmen sind zu dokumentieren.

#### 6 Probenvorbehandlung

- Tiefgefrorene Proben müssen vor der Weiterverarbeitung unbedingt vollständig aufgetaut werden, da Konzentrationseffekte im Innern der Probe, das zuletzt gefriert, auftreten können. Das Auftauen tiefgefrorener Proben kann z. B. in einem maximal  $40$  °C warmen Wasserbad erfolgen. Gelegentliches sanftes Schütteln der Probe wird empfohlen.
- Die nach Pkt. 5 konservierte Probe/Teilprobe muss vor dem Test auf eine Temperatur von  $20 \pm 2$  °C gebracht werden.
- Die Probe wird nach DIN 38 402 - A 30 homogenisiert.
- Der pH-Wert des Abwassers vor Testbeginn wird dokumentiert. Falls erforderlich, wird das Abwasser vor Ansatz der Verdünnung durch Zusatz von Salzsäure oder Natronlauge auf einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,2$  eingestellt. Die Konzentration der zur Neutralisierung erforderlichen Säure oder Base ist so zu wählen, dass das zuzugebende Volumen möglichst klein ist. Eine Über- oder Unterschreitung des Neutralpunktes ist zu vermeiden.
- Sind im Abwasser störende, ungelöste Stoffe (grobe Bestandteile) enthalten, bleibt die Probe 1 - 2 Std. stehen. Das überstehende Wasser wird für den Test verwendet. Auf diese Weise erübrigt sich in der Regel eine Sedimentation in den Verdünnungsansätzen.

## 7 Verdünnungswasser

- Es wird empfohlen, synthetisches Wasser nach DIN 38 412 - L 30 als Verdünnungswasser bei der Durchführung der Tests zu verwenden. Dieses Wasser ist identisch mit dem Basis-Medium (Makro-nährstoffe) des M4-Mediums (s. Anhang). Das komplette M4-Medium soll aufgrund komplexierender Bestandteile nicht verwendet werden. Es hat sich bewährt, das Wasser mindestens einen Tag vor Gebrauch herzustellen und anschließend bis zur Sauerstoffsättigung zu belüften. Es bleibt dann bis zum Testansatz unbelüftet stehen.
- Wird Trinkwasser als Verdünnungswasser eingesetzt, so ist zu bestätigen und zu dokumentieren, dass die Konzentrationen an Calcium- und Magnesium-Ionen, das Verhältnis an Calcium- zu Magnesium-Ionen sowie die Säurekapazität des Wassers in den von DIN 38 412 - L 30 geforderten Bereichen liegen (Kontrollkarte).
- Das Verdünnungswasser wird vor Testbeginn auf eine Temperatur von  $20 \pm 2$  °C gebracht.

## 8 Referenzsubstanz

Zur Überprüfung der Sensitivität der Daphnien sind mindestens alle 2 Monate Tests mit Kaliumdichromat als Referenzsubstanz durchzuführen. Die Methode für die Untersuchung der Referenzsubstanz ist in DIN 38 412 - L 11 beschrieben. Es wird empfohlen, den Stammsatz mit einer Titerlösung Kaliumdichromat in destilliertem Wasser herzustellen. Die weiteren Konzentrationen werden in Verdünnungswasser nach DIN 38 412 - L 30 angesetzt. Auf eine pH-Wert Einstellung wird hierbei verzichtet. Es werden 20 Tiere pro Konzentrationsstufe verwendet. Die Inkubation im Dunkeln ist nicht erforderlich. Zur Dokumentation der Testdurchführung ist ein entsprechendes Testprotokoll (z.B. Musterprotokoll s. Seite 9) anzufertigen. Die  $EC_{50}$ -Werte für Kaliumdichromat sind in einer Kontrollkarte zu dokumentieren.

**Anmerkung 2:** *Die  $EC_{50}$ -Werte für Kaliumdichromat (Titerlösung) liegen in der Regel bei 0,6 - 2,4 mg/l für im Medium M4 gezüchtete Daphnien des Klons 5. Laborintern werden in der Regel geringere Spannbreiten für die  $EC_{50}$ -Werte ermittelt. Größere Abweichungen von den ermittelten Spannbreiten geben einen Hinweis auf Störungen in der Zucht.*

## 9 Durchführung

- Der pH-Wert der Kontroll- und Testansätze soll jeweils zu Beginn und am Ende des Tests gemessen und protokolliert werden.
- Die Einhaltung der geforderten Temperatur von  $20 \pm 2$  °C während der Testdauer ist zu überprüfen und zu dokumentieren.  
Es gelten die bereits unter Pkt. 3 bezüglich der Hälterungstemperatur gemachten Anmerkungen. Die Ansätze können auch in einem Wasserbad temperiert werden.
- Bei stark sauerstoffzehrenden Abwässern soll der Sauerstoffgehalt zumindest in der niedrigsten Verdünnungsstufe G zu Beginn und am Ende des Tests gemessen und dokumentiert werden.
- Zur Dokumentation der Testdurchführung ist ein entsprechendes Testprotokoll (z.B. Muster, s. Seite 11) anzufertigen.
- An der Oberfläche schwimmende Daphnien sind zu protokollieren (ggf. in der Spalte "Bemerkungen"). Sie werden als schwimmunfähig gezählt.
- Die Norm (DIN 38 412 - L30) lässt unter Punkt 11 eine schwimmunfähige Daphnie im Kontrollansatz zu, ohne dass das Ergebnis ungültig wird. Deshalb ist unter Punkt 3.5 dieser Norm unter " $G_D$ -Wert = Kleinster Wert von G des Testansatzes, in dem unter den Bedingungen dieser Norm alle Daphnien ihre Schwimmfähigkeit behalten" zu verstehen, dass mindestens 9 Daphnien ihre Schwimmfähigkeit behalten (s.a. Punkt 12 der Norm).

**Anhang****M4-Medium nach Elendt-Schneider**, Elendt, B.-P. (1990) [1]

Als Chemikalien werden solche des Reinheitsgrades "zur Analyse", als Wasser wird destilliertes Wasser oder Wasser gleichen Reinheitsgrades verwendet.

Es hat sich bewährt, die Bestandteile des M4-Mediums wie folgt zu Stammlösungen zusammenzufassen:

**1. Makronährstoffe** (= synthetisches Verdünnungswasser für akute Tests)

1.1 Calciumchlorid-Lösung	73,45 g/	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O
1.2 Magnesiumsulfat heptahydrat-	123,3 g/l	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
1.3 Kaliumchlorid-Lösung	5,8 g/l	KCl
1.4 Natriumhydrogencarbonat-Lösung	64,8 g/l	NaHCO <sub>3</sub>

**2. Mikronährstoffe**

## 2.1 Kationenlösung

7210 mg	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	
6120 mg	LiCl	
1420 mg	RbCl	
3040 mg	SrCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	
335 mg	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	
260 mg	ZnCl <sub>2</sub>	
200 mg	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	in Wasser lösen und mit Wasser auf 2 Liter auffüllen

## 2.2 Anionenlösung

548 mg	NaNO <sub>3</sub>	
5719 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	
32 mg	NaBr	
126 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	
6,5 mg	KJ	
6,66 mg	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O	
1,15 mg	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	in Wasser lösen und mit Wasser auf 1 Liter auffüllen

## 2.3 Silikatlösung

21475 mg/l Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>

**Anmerkung 4:** *Nicht alle im Handel erhältlichen Silikate sind löslich.  
Ein geeignetes Silikat ist z.B. Natriummetasilikat, Fa. Aldrich*

## 2.4 Eisen-/EDTA-Lösung

500 mg Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O  
199,1 mg FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

Beide Lösungen werden einzeln in 500 ml Wasser angesetzt, zusammengegeben und sofort autoklaviert.  
**Diese Lösung ist im Dunkeln aufzubewahren.**

### 2.5 Phosphatlösung

286 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

368 mg  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

in Wasser lösen und mit Wasser auf 1 Liter auffüllen

### 2.6 Vitaminlösung

750 mg Thiaminchloridhydrochlorid

10 mg Cyanocobalamin ( $\text{B}_{12}$ )

7,5 mg Biotin

in Wasser lösen und mit Wasser auf 1 Liter auffüllen  
(portionsweise einfrieren)

### Herstellung von 10 Litern M4-Medium

40 ml der Lösung 1.1

10 ml der Lösung 1.2

10 ml der Lösung 1.3

10 ml der Lösung 1.4

(1.1 - 1.4 in 10 l  $\text{H}_2\text{O}$  = synthetisches Verdünnungswasser  
nach DIN 38 412 Teil 30)

1 ml der Lösung 2.1 (Kationenlösung)

5 ml der Lösung 2.2 (Anionenlösung)

2 ml der Lösung 2.3 (Silikatlösung)

50 ml der Lösung 2.4 (Eisen-/EDTA-Lösung)

5 ml der Lösung 2.5 (Phosphatlösung)

1 ml der Lösung 2.6 (Vitaminlösung)

Die Vitaminlösung sollte erst kurz vor Gebrauch des  
Mediums aufgetaut und zugegeben werden.

mit Wasser auf 10 l auffüllen

Der pH-Wert des M4-Mediums stellt sich auf ca. 8,3 - 8,4 ein.

### Literatur

- [1] Elenet, B.-P. (1990) Selenium deficiency in Crustacea. An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma* 154: 25-33.







**REFERENZPROTOKOLL** (Mindestangaben)

**DAPHNIENTEST** nach DIN 38 412 – L11

\_\_\_\_\_  
Untersuchungsstelle

Referenzsubstanz Kaliumdichromat:				
(Titer)lösung:	Konzentration: (mg/l)	Ansatzdatum:	Zwischenverdünnung:	Datum:
Daphnien-Bezugsquelle:			Zuchtmedium:	

Testbeginn: Datum/Uhrzeit: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ Handzeichen: \_\_\_\_\_

Konzentration K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> mg/l	schwimmunfähige Daphnien nach 24 h	
	Anzahl	in % (Summe)
	a)	
	b)	
	a)	
	b)	
	a)	
	b)	
	a)	
	b)	
	a)	
	b)	
	a)	
	b)	

Temperatur: Minimum: \_\_\_\_\_ °C Maximum: \_\_\_\_\_ °C

Bemerkungen: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Ergebnis: EC <sub>50</sub> = _____ mg/l
---

\_\_\_\_\_  
Datum / Unterschrift



**TESTPROTOKOLL** (Mindestangaben)

**DAPHNIENTEST nach DIN 38 412 - L30**

\_\_\_\_\_  
Untersuchungsstelle

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

Probenvorbehandlung:					
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

Versuchsdurchführung:				
Verdünnungswasser:		<input type="checkbox"/> synthetisch nach DIN <input type="checkbox"/> Trinkwasser		
Testbeginn:		Datum / Uhrzeit: _____ / _____		Handzeichen: _____
Verdünnungsstufe G	schwimmunfähige Daphnien nach 24 h	pH-Wert		Bemerkungen (z.B. an der Oberfläche schwimmende Daphnien)
		Anfang	Ende	
	a)			
	b)			
	a)			
	b)			
	a)			
	b)			
	a)			
	b)			

Temperatur: Minimum: \_\_\_\_\_ °C      Maximum: \_\_\_\_\_ °C

Bemerkungen: \_\_\_\_\_

<b>Ergebnis: G<sub>D</sub> =</b>
----------------------------------

\_\_\_\_\_  
Datum / Unterschrift



	(hier den Namen des Labors eintragen)
<b>AQK-Kontrollkarte für den Daphnien-Kurzzeittest mit der Referenzsubstanz Kaliumdichromat</b>	
<b>Parameter:</b> akute Daphnien-toxizität EC <sub>50</sub> -Kaliumdichromat	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> mg/l 3,0 2,0 1,0 0
<b>Methode:</b> DIN 38 412-L11 und LAWA-AQS-Merkblatt P-9/2 zu DIN 38 412-L30	
<b>Matrix:</b> Verdünnungswasser nach DIN 38 412-L30	
	EC <sub>50</sub> mg/l:
	Datum:
	Bemerkung / Handzeichen: