

Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von Photobacterium phosphoreum - Leuchtbakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien (DIN 38 412 - L 34)

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 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 konservierten 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 von 2%-iger NaCl-Lösung zu verwenden.

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

6 Geräte

- 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 gemessen 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

- Die Herkunft der Leuchtbakterien, Präparatenamen, Chargennummer sowie das Bezugs- und Verfallsdatum und die Lagerungsbedingungen sind anzugeben.
- Bei der Beschaffung der Bakterienpräparate ist darauf zu achten, daß die Kühlkette nicht unterbrochen wird.
Gleiches gilt für die Lagerung der Bakterien im Labor.

8 Testdurchführung

- Dehydratisierte und dann wieder eingefrorene Bakterien sind nur für Vorversuche zu verwenden.
- Der Zeitpunkt der Rekonstitution der Bakterien und des Testbeginns sind zu dokumentieren.
- Die Angleichzeit nach Herstellung der Testsuspensionen muß mindestens 15 Minuten betragen und sollte eine halbe Stunde nicht überschreiten.
- Der Zeitpunkt des Testbeginns ist zu dokumentieren.

Anmerkung 2: *Erhöhte Kalium-, Calcium-, Magnesium-Gehalte [5] in der Probe können wegen eines relativen Mangels dieser Mineralstoffe im Kontrollansatz speziell bei **lyophilisierten** Bakterien zu Förderungen des Leuchtens führen. Durch diese Förderungen können u. U. toxische Effekte abgeschwächt oder aufgehoben werden (falsch negativer Befund). Ergebnisrelevant erhöhte Kalium-Gehalte liegen z.B. in aller Regel bei Deponiesickerwässern vor. Diese Förderungen lassen sich weitgehend vermeiden, indem nur zur Herstellung der Testsuspension (Bakteriensuspension + Verdünnungswasser, s. Abschnitt 3.5 der Norm) anstatt einer 2 %igen NaCl-Lösung eine Lösung mit NaCl, MgCl₂ und KCl verwendet wird. (Herstellung der Lösung: 20 g/l NaCl + 2,035 g/l MgCl₂ × 6H₂O + 0,3 g/l KCl in A. dest. lösen und mit A. dest. auf 1 l auffüllen). Die Verdünnungsreihe für das Testgut (s. Abschnitt 3.6 der Norm) wird weiterhin mit einer 2 %igen NaCl-Lösung hergestellt.*

- Wenn bei gefärbten Proben in den beiden für den G_L-Wert wichtigen Verdünnungsstufen noch eine farbbedingte Beeinflussung des Meßergebnisses möglich erscheint, ist eine Farbkorrektur, z.B. mit speziellen Farbkorrekturküvetten, durchzuführen (s. Abschnitt 11).

9 Gültigkeitskriterien

9.1 Referenzsubstanzen

- Bei jeder gelieferten Bakteriencharge sind Testansätze mit 3 Referenzsubstanzen zu testen.
- Parallel zu jedem Test ist mindestens eine der drei Referenzsubstanzen mit zu testen:
Für Referenzansätze mit jeweils einer Konzentration (Endkonzentration im Test) von

0,8 mg/l Zn²⁺ als Zinksulfat Heptahydrat (ZnSO₄ × 7 H₂O, p.A.),
oder 4,0 mg/l 3,5-Dichlorphenol (C₆H₄OCl₂, p.A.),
oder 14 mg/l Cr(VI) als Kaliumdichromat (K₂Cr₂O₇, p.A.)
(Lösungen nicht neutralisiert; einzeln prüfen)

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

- Falls eine mit Kalium und Magnesium aufgestockte Testsuspension verwendet wird, sind Referenzansätze mit folgenden Konzentrationen mit zu testen:

2,2 mg/l Zn²⁺ als Zinksulfat Heptahydrat (ZnSO₄ × 7 H₂O, p.A.),
oder 3,4 mg/l 3,5-Dichlorphenol (C₆H₄OCl₂, p.A.),
oder 18,7 mg/l Cr(VI) als Kaliumdichromat (K₂Cr₂O₇, p.A.)
(Lösungen nicht neutralisiert; einzeln prüfen).

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

9.2 Weitere Anforderungen

Der f_k -Wert muß mindestens 0,6 betragen und darf den Wert 1,3 nicht übersteigen.

- Die Abweichungen der Parallelbestimmungen von ihrem Mittelwert dürfen sowohl in den Kontrollansätzen als auch in 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 3: *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] 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
- [3] 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).
- [4] 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.
- [5] Klein, B.
Die Rolle des Kaliums bei Toxizitätstests mit Leuchtbakterien.
Zeitschrift für angewandte Zoologie, 79. Jg. (1992/1993), Heft 2, S. 199-219.
- [6] Klein, B.
Möglichkeiten und Grenzen der Farbkorrektur im Leuchtbakterientest mit Hilfe von Absorptions-Korrektur-Küvetten.
Z. Wasser-Abwasser-Forsch. 23 (1990), 70-74.
- [7] 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 ?	
	I_0	I_{K30}	I_{K30}/I_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	
		I_0	I_{T30}	I_{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 prozentuale Abweichung der f_{K30}-Werte der Parallelansätze von ihrem Mittelwert $((\bar{f}_{K30} - I_{K30}/I_0) / \bar{f}_{K30}) \cdot 100$ ist ein Maß für die Schwankungsbreite der Kontrollansätze.</p> <p>2) Die Abweichung 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 - L34

(mit gefriergetrockneten 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
Aufsalzung:	<input type="checkbox"/> 20 g/l NaCl				
andere Verfahren:					

Leuchtbakterienpräparat:		
Präparatenamen:		Chargen:
Bezugsquelle:		Nummer: Datum:
		Verfallsdatum:
Lagerungsbedingungen:		
Überprüfung der Bakteriencharge mit 3 Referenzsubstanzen am:		

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:

Rekonstitution der Bakterien: Datum/Uhrzeit: _____ / _____

Testbeginn (I₀-Messung): Datum/Uhrzeit: _____ / _____ Handzeichen _____

TESTPROTOKOLL (Mindestangaben)

Fortsetzung

LEUCHTBAKTERIENTEST nach DIN 38 412 - L34
(mit gefriergetrockneten Bakterien)

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⁾
80%							
1	1						
2							
50%							
3	2						
4							
5	3						
6							
Referenzansätze (Endkonzentration im Test)							
Zn ²⁺ 0,8 mg/l							
3,5-DCP 4,0 mg/l							
Cr(IV) 14 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: $G_L =$

.....
Datum / Unterschrift