

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung
Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)
 Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf den Sauerstoffverbrauch
 von *Pseudomonas putida*
 (Pseudomonas-Sauerstoffverbrauchshemmtest) (L 27)

DIN
38 412
 Teil 27

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; bio-assays (group L); determination of the inhibitory effect of waste water on the oxygen consumption of *Pseudomonas putida* (L 27)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des boues; essais biologiques (groupe L); détermination de l'effet des eaux résiduaires à l'inhibition de la consommation d'oxygène de *Pseudomonas putida* (L 27)

Diese Norm wurde gemeinsam mit der Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker aufgestellt (siehe Erläuterungen).

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

1 Allgemeine Angaben

Der Test wird zur Bestimmung bakterientoxischer Wirkungen in Abwasser eingesetzt. Als Modellorganismus dient *Pseudomonas putida*, stellvertretend für Bakterien aus Belebtschlämmen und Oberflächengewässern. Die Stoffwechselaktivität der Bakterien wird als Sauerstoffverbrauchsrate erfaßt.

2 Anwendungsbereich

Das Verfahren erlaubt nach einer Einwirkzeit von 30 min Aussagen über die Atmungshemmung von *Pseudomonas putida* durch Abwasser. Das Ergebnis gibt einen Hinweis auf bakterientoxische Wirkungen, die den biologischen Abbau in Kläranlagen stören können.

3 Begriffe

3.1 Sauerstoffverbrauchsrate

Im Sinne dieser Norm Verbrauch von Sauerstoff durch *Pseudomonas putida*, bezogen auf das Volumen und die Zeit.

3.2 Sauerstoffverbrauchshemmung

Im Sinne dieser Norm Abnahme der Sauerstoffverbrauchsrate von *Pseudomonas putida* in Gegenwart eines Abwassers, verglichen mit der eines Kontrollansatzes.

Fortsetzung Seite 2 bis 16

Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

3.3 Verdünnungsansatz

Gemisch aus Abwasser und Verdünnungswasser, in dem der Test durchgeführt wird (aus: DIN 38 412 Teil 30/03.89).

3.4 Testmedium

Im Sinne dieser Norm Mischung aus Abwasser, Verdünnungswasser und Glucoselösung.

3.5 Testansatz

Im Sinne dieser Norm Mischung aus Abwasser, Glucoselösung, Bakteriensuspension und gegebenenfalls Verdünnungswasser.

3.6 Kontrollansatz

Im Sinne dieser Norm Mischung aus Verdünnungswasser, Glucoselösung und Bakteriensuspension (ohne Abwasser).

3.7 Stammkultur

Kultur einer Bakterienart zur Bewahrung des ursprünglichen Teststamms im Laboratorium und zur Bereitstellung des Impfmateri als für die Vorkultur (aus: DIN 38 412 Teil 8/03.91).

3.8 Vorkultur

Im Sinne dieser Norm Bakterienkultur zur Anzucht einer genügenden Anzahl Zellen für die Bakteriensuspension.

3.9 Bakteriensuspension

Im Sinne dieser Norm Bakterien in einer Pufferlösung für die Zugabe zu Test- und Kontrollansätzen.

3.10 Verdünnungsstufe G (auch: Verdünnungsfaktor)

Im Sinne dieser Norm Kehrwert des Volumenanteils an Abwasser im Testansatz (aus: DIN 38 412 Teil 33/03.91).

BEISPIEL:

Wird ein Abwasser mit dem fünffachen Volumen Verdünnungswasser (einschließlich Glucoselösung und Bakteriensuspension) auf das insgesamt sechsfache Volumen verdünnt, so ist die Verdünnungsstufe $G = 6$.

3.11 G_{PS} -Wert

Kleinster Wert von G im Testansatz, bei dem unter den Bedingungen dieses Verfahrens eine Hemmung des Sauerstoffverbrauchs $< 20\%$ gemessen wird.

ANMERKUNG: Der Index PS bedeutet hier Pseudomonas-Sauerstoffverbrauch.

4 Grundlage des Verfahrens

In Anwesenheit eines Nährsubstrates hat eine Suspension mit konstanter Zellzahl an *Pseudomonas putida* eine konstante Sauerstoffverbrauchsrate. Diese ist mit der Sauerstoffsonde meßbar. Die Zugabe eines giftigen Abwassers hat eine Abnahme der Sauerstoffverbrauchsrate zur Folge.

Die Sauerstoffverbrauchshemmung wird durch einen Vergleich mit einem Kontrollansatz ohne Abwasser bestimmt. Die Hemmwirkung wird durch stufenweises Verdünnen des Abwassers mit Verdünnungswasser (siehe Abschnitt 8.1) in ganzzahligen Volumenverhältnissen bestimmt. Als Maß für die Hemmwirkung eines Abwassers auf die Atmung von *Pseudomonas putida* dient die Angabe der Verdünnungsstufe (G_{PS} -Wert), deren Hemmwert die Schwelle 20 % unterschreitet.

5 Störungen

Flüchtige, schäumende und im Wasser ungelöste Stoffanteile können die Reproduzierbarkeit des Testergebnisses beeinträchtigen (siehe DIN 38 412 Teil 1).

In Anwesenheit störender, ungelöster Stoffe darf die Wasserprobe bis 2 h vor der Analyse stehenbleiben, um ein Absetzen dieser Stoffe zu ermöglichen.

Wenn starke Oxidations- oder Reduktionsmittel die Sauerstoffkonzentration verändern, muß dieser Effekt in einem Kontrollansatz ohne Bakterienzugabe erfaßt werden.

6 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zur Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf den Sauerstoffverbrauch von *Pseudomonas putida* (L 27):

Verfahren DIN 38 412 — L 27

7 Geräte

Die Volumenangaben für die Glasgeräte sind Beispiele. Die Geräte müssen dem jeweiligen Versuchsansatz angepaßt werden.

- pH-Meßgerät
- Sauerstoffmeßgerät (Sauerstoffsonde mit Temperaturkompensation), z. B. nach DIN 38 408 Teil 22
- Registriergerät, z. B. Linienschreiber
- Meßgefäß, z. B. Stehkolben, Nennvolumen 50 ml, z. B. Kolben DIN 12 348 – SANS 50-19 mit Verdrängungstrichter und Fixierung (siehe Bild 1)¹⁾
- oder
- Durchflußzelle aus Polyacrylglas mit Bohrung für die Sauerstoffsonde und Magnetrührstab, z. B. Länge 25 mm und Durchmesser 6 mm (siehe Bild 2)¹⁾

¹⁾ Über Bezugsquellen gibt Auskunft: Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN, Postfach 11 07, 1000 Berlin 30

- Magnetrührplatte
- Zentrifuge, möglichst mit Kühlaggregat (die Temperatur nach dem Zentrifugieren soll 30 °C nicht überschreiten)
- Schüttelmaschine mit Thermostatisierung zur Aufnahme von z. B. Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 500 ml
- Sterilisator, z. B. nach DIN 58 946 Teil 2
- Brutschrank, z. B. nach DIN 58 945 Teil 1
- Druckluftversorgung (ölfrei, z. B. über Aktivkohle und Filterwatte gereinigt)
- Wasserbad mit Thermostat, z. B. nach DIN 12 879 Teil 1
- Spektral- oder Filterphotometer mit Küvette, Schichtdicke 1 cm
- Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 100, 250 und 1000 ml, z. B. Kolben DIN 12 380 – EE 100
- Meßkolben, Nennvolumen 100 und 1000 ml, z. B. Meßkolben DIN 12 664 – MS A 100
- Meßpipette, Nennvolumen 10 ml, z. B. Pipette DIN 12 697 – MPAS 10-01
- Kolbenhubpipetten, Nennvolumen 1000 µl und 2 ml, z. B. Pipette DIN 12 650 – L 1000
- Thermometer, z. B. Thermometer DIN 12 775 – E 0,5/0/50
- Meßzylinder, Nennvolumen 250 ml, z. B. Meßzylinder DIN 12 680 – ME 250
- Kulturröhrchen, z. B. Durchmesser 16 mm, Höhe 160 mm, mit luftdurchlässigem, sterilem Verschluß
- Impföse

8 Chemikalien

Als Chemikalien werden, wenn nicht anders angegeben, solche des Reinheitsgrades "zur Analyse", als Wasser wird deionisiertes oder Wasser gleichen Reinheitsgrades verwendet.

8.1 Verdünnungswasser

Lösung 1:

- 8,5 g Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4
- 21,75 g Dikaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4
- 33,4 g Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 1,7 g Ammoniumchlorid, NH_4Cl
- in etwa 500 ml Wasser lösen, Lösung mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Lösung 2:

- 22,5 g Magnesiumsulfat-heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, in 1 l Wasser lösen.

Lösung 3:

- 27,5 g Calciumchlorid, CaCl_2 , in 1 l Wasser lösen.

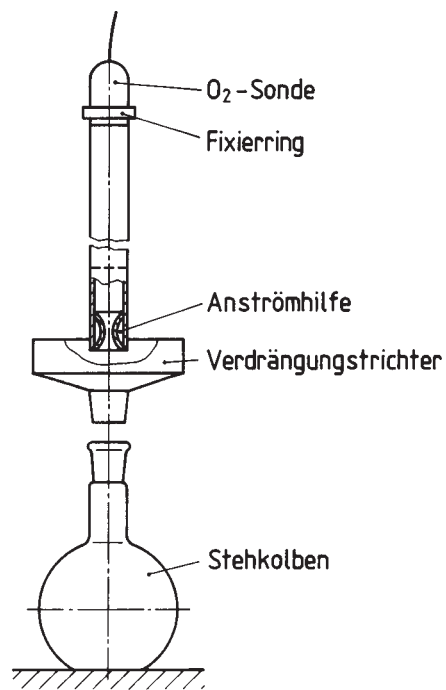


Bild 1: Stehkolben mit Normschliff, Verdrängungstrichter, Fixierring und Anströmhilfe

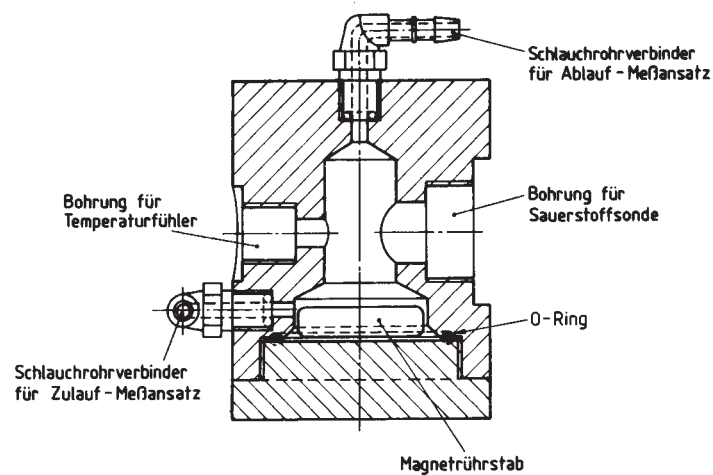


Bild 2: Schematische Darstellung einer Durchflußzelle (Beispiel)