

DIN 38412-3



ICS 13.060.70

**Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und
Schlammuntersuchung –
Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) –
Teil 3: Toxizitätstest zur Bestimmung der
Dehydrogenasenaktivitätshemmung in Belebtschlamm (TTC-Test) (L 3)**

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge –
Bio-assays (group L) –

Part 3: Toxicity test for assessing the inhibition of the dehydrogenase activity of activated
sludge microorganisms (TTC-Test) (L 3)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des
boues –

Essais biologiques (groupe L) –

Partie 3: Essai de toxicité pour l'évaluation de l'inhibition de l'activité de déhydrogénase
des micro-organismes des boues activées (TTC-Test) (L 3)

Gesamtumfang 22 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Grundlage des Verfahrens	7
5 Störungen	7
5.1 Allgemeines	7
5.2 Testgut, das Formazan entfärbt	7
5.3 Testgut mit Eigenfärbung	7
5.4 Prüfung des Testgutes mit reduzierenden Eigenschaften	8
5.5 Lipophile Stoffe	8
6 Bezeichnung	8
7 Reagenzien	8
8 Belebtschlamm	10
8.1 Allgemeines	10
8.2 Vorbereitung des Belebtschlammes	10
9 Geräte	11
10 Probenahme und Probentransport	11
11 Durchführung	11
11.1 Probenvorbereitung des Testgutes	11
11.2 Testdurchführung	12
12 Gültigkeitskriterien	14
13 Berechnung	14
14 Angabe der Ergebnisse	15
15 Prüfbericht	15
16 Verfahrenskennndaten	16
Anhang A (informativ) Verfahrensvariante unter Anwendung der Filtrationstechnik	17
A.1 Allgemeines	17
A.2 Störungen	17
A.3 Reagenzien	17
A.4 Belebtschlamm	17
A.5 Geräte	17
A.6 Probenahme und Probentransport	18
A.7 Durchführung	18
A.8 Gültigkeit	19
A.9 Berechnung der prozentualen Hemmung bei Messung der Extinktion	19
A.10 Angabe des Ergebnisses	19
A.11 Prüfbericht	19
A.12 Verfahrenskennndaten	20
Anhang B (informativ) Erläuterungen	21
Literaturhinweise	22

Tabellen

Tabelle 1 — Belebtschlamm-Ansätze	10
Tabelle 2 — Ansatzreihe	13
Tabelle 3 — Verfahrenskennndaten nach DIN 38402-42 für die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität	16
Tabelle A.1 — Verfahrenskennndaten nach DIN 38402-42 für die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität nach der Filtrationstechnik	20

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitskreis NA 119-01-03-05-08 AK „TTC-Test“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im Normenausschuss Wasserwesen (NAW) erarbeitet.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. Das DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Diese Norm ist Bestandteil der Reihe

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Toxizitätstest zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivitätshemmung in Belebtschlamm (TTC-Test) (L 3).

Diese Norm wurde gemeinsam mit der Wasserchemischen Gesellschaft — eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker — aufgestellt (siehe Anhang B).

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

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

Zu DIN 38412 „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)“ gehören weitere Teile. Eine Übersicht der Gruppen A bis T der „Deutschen Einheitsverfahren“ enthält Anhang B.

WARNUNG — Anwender dieser Norm sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Norm gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

Einleitung

Mikroorganismen enthalten Enzyme (Biokatalysatoren), die den Abbau der Abwasserinhaltsstoffe bewirken. Eine Gruppe dieser Enzyme sind die Dehydrogenasen; sie spalten von den Substanzen (Abwasserinhaltsstoffen) Wasserstoffatome ab. Je mehr Dehydrogenasen im Belebtschlamm enthalten sind, desto aktiver ist der Schlamm. Nach diesem Verfahren wird durch die Dehydrogenaseaktivität der lebenden Zellen im Belebtschlamm aus Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Triphenylformazan (TPF) gebildet. Da die Dehydrogenasenaktivität mit dem Tod der Zellen erlischt, ist Anwesenheit und Menge an gebildetem TPF ein Maß für die Schlammaktivität.

SICHERHEITSVORKEHRUNGEN — Belebtschlämme und Abwässer können potentiell pathogene Organismen enthalten. Daher müssen geeignete Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden, wenn mit ihnen umgegangen wird.

Toxische Testsubstanzen und solche mit unbekannten Eigenschaften müssen mit Vorsicht gehandhabt werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zur Abschätzung der akuten Hemmwirkung eines Testgutes auf hauptsächlich heterotrophe Bakterien aus Belebtschlamm kommunaler und/oder industrieller Abwasserbehandlungsanlagen fest. Die Hemmwirkung wird nach einer Inkubationszeit von 1 h bestimmt.

Das Verfahren ist auf Abwasser und nicht flüchtige, wasserlösliche chemische Stoffe anwendbar. Es können auch unlösliche Stoffe erfasst werden, wenn sorgfältig darauf geachtet wird, dass das Testgemisch homogen ist.

Das Verfahren erlaubt neben der Bestimmung toxischer Effekte auch die quantitative Ermittlung der biochemischen Aktivität eines Inokulums.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

DIN 38402-51, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser und Schlammuntersuchung — Allgemeine Angaben (Gruppe A) — Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analysenergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen (A 51)*

DIN EN ISO 5667-16, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 16: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

DIN ISO 23753-1, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität in Böden — Teil 1: Verfahren mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1 Belebtschlamm
zusammengeballte Biomasse (Flocken), die sich in Abwasser durch die Tätigkeit von Bakterien und anderen Mikroorganismen bei Vorhandensein von gelöstem Sauerstoff bildet

[ISO 6107-1:2004, 2]

3.2 Inhibitionskontrollansatz
Ansatz zur Inhibition mit Dichlorphenol (DCP)

3.3 Nährmedium
wässrige Lösung von Nährstoffen, die für das Bakterienwachstum notwendig sind

[DIN 38412-37:1999-04, 3.6]

3.4 Nährmedium-Referenzansatz
Ansatz zur Aktivierung mit Nährmedium

3.5**Testansatz**

Ansätze mit dem zu prüfenden Testgut mit Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung

3.6**Testgut**

definierte Substanz, Mischung, chemisches Produkt oder Abwässer, die geprüft werden sollen

3.7**Überstandswasser**

Wasser, das durch Zentrifugieren, Sedimentieren oder Filtrieren des Belebtschlammes gewonnen wird

3.8**Überstandswasser-Kontrollansatz**

Ansatz mit dem im Überstandswasser verbliebenen Belebtschlamm, mit Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung versetzt

3.9**Verdünnungswasser-Kontrollansatz**

in Verdünnungswasser aufgenommener Belebtschlamm, mit Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung versetzt

4 Grundlage des Verfahrens

Farbloses, wasserlösliches Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), welches als Indikatorsubstanz dient, wird mit Hilfe der im Belebtschlamm enthaltenen Dehydrogenasen zu rotem, wasserunlöslichem Triphenylformazan (TPF) reduziert. Das TPF wird anschließend mit Ethanol aus den Mikroorganismen extrahiert und bei einer Wellenlänge von 485 nm photometrisch bestimmt.

5 Störungen**5.1 Allgemeines**

Belebtschlämme verschiedener Herkunft können unterschiedlich auf zu prüfendes Testgut reagieren. Da die Inkubationszeit nur 1 h beträgt, muss berücksichtigt werden, dass eine Hemmwirkung, aber auch eine Aktivierung über eine längere Zeitspanne, z. B. in einer kontinuierlich betriebenen Abwasserbehandlungsanlage mit Belebtschlamm, ab- oder zunehmen kann.

5.2 Testgut, das Formazan entfärbt

Die Matrix kann Stoffe enthalten, die auch ohne Dehydrogenaseaktivität Formazan entfärben.

Dies wird wie folgt geprüft:

8 ml Probe mit 1 ml TPF-Stammlösung (7.9) versetzen. Bei Entfärbung kann das Verfahren nicht angewendet werden.

5.3 Testgut mit Eigenfärbung

Ist das Testgut stark gefärbt, können die Farbstoffe bei der Ethanolextraktion mit aufgenommen werden und anschließend bei der photometrischen Auswertung zu Überbefunden führen.

In diesem Fall wird zusätzlich ein Probenansatz ohne TTC-Lösung parallel bestimmt. Bei der Ergebnisberechnung wird die ermittelte Extinktion ohne TTC-Zusatz von der ermittelten Extinktion mit TTC-Zusatz subtrahiert; dies ist im Analysenbericht anzugeben.

Zusätzlich muss die Eigenfärbung des Belebtschlammes berücksichtigt werden.