

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung
Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)
 Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser
 gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest)
 über Verdünnungsstufen (L 33)

DIN
38 412
 Teil 33

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; bio-assays (group L); determination of the non-poisonous effect of waste water to green algae (Scenedesmus chlorophyll fluorescence test) by dilution limits (L 33)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des boues; essais biologiques (groupe L); détermination de l'effet non-toxicité des eaux résiduaires vis à vis des algues chlorophycées (Scenedesmus test de fluorescence de chlorophyll) par des limites de dilution (L 33)

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

Als Testalge dient die in Kultur meist einzellige Grünalge *Scenedesmus subspicatus* CHODAT¹⁾ der Ordnung Chlorococcales (Chlorophyta, Chlorophyceae) stellvertretend für Primärproduzenten im Plankton des Süßwassers.

Die Testalgen werden unter festgelegten Bedingungen in einem definierten Nährmedium in verschiedenen Konzentrationen (Verdünnungsstufen) des Abwassers über mehrere Generationen kultiviert; dabei können bestimmte Stoffe in Abhängigkeit von ihrer Konzentration die Biomasseproduktion der Algen hemmen. Als Maß für die Algenbiomasse gilt die Chlorophyll-Fluoreszenz.

2 Anwendungsbereich

Das Verfahren ist auf Abwasser anwendbar. Es wird zur Bestimmung von Verdünnungsstufen als Maß für die innerhalb von 72 h auftretende, nicht giftige Wirkung eines Abwassers gegenüber Grünalgen angewendet.

¹⁾ Zu beziehen durch: Pflanzenphysiologisches Institut, Nikolausberger Weg 18, 3400 Göttingen (Testalge: Stamm Nr 8681 SAG)

Fortsetzung Seite 2 bis 12

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

Jede Art der Vervielfältigung, auch auszugsweise, nur mit Genehmigung des DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, gestattet.

3 Begriffe

3.1 Algenbiomasse

Biomasse, die durch Messung der in vivo-Chlorophyll-Fluoreszenz bestimmt wird.

3.2 Testansatz

Im Sinne dieser Norm Mischung aus Abwasser, Verdünnungswasser, Nährmedium und Inokulum.

3.3 Kontrollansatz

Mischung aus Verdünnungswasser, Nährmedium und Inokulum (ohne Abwasser) (aus: DIN 38 412 Teil 9/05.89).

3.4 Verdünnungsstufe G (auch: Verdünnungsfaktor)

Im Sinne dieser Norm Kehrwert des Volumenanteils an Abwasser im Testansatz.

Beispiel:

Wird eine Abwasserprobe mit dem siebenfachen Volumen an Verdünnungswasser einschließlich Nährlösung und Inokulum auf insgesamt das achtfache Volumen verdünnt, so ist die Verdünnungsstufe $G = 8$.

3.5 G_A -Wert

Kleinsten Wert von G des Testansatzes, in dem unter den Bedingungen dieses Verfahrens eine Hemmwirkung der Biomasseproduktion $< 20\%$ gemessen wird, sofern bei höheren Verdünnungsstufen keine Hemmung $> 20\%$ festgestellt wird.

3.6 Stammkultur

Kultur einer Algenart zur Bewahrung des ursprünglichen Teststamms im Laboratorium und zur Bereitstellung des Impfmateri als für die Vorkultur (aus: DIN 38 412 Teil 9/05.89).

3.7 Vorkultur

Algenkultur zur Adaptation der Testalgen an die Testbedingungen und zur Anzucht des Inokulums für den Testansatz.

3.8 Testkultur

Algenkultur im Testansatz (aus: DIN 38 412 Teil 9/05.89).

3.9 Einsaat, Inokulum (Impfmateri als)

Zum Animpfen einer Algenkultur verwendete Algensuspension (aus: DIN 38 412 Teil 9/05.89).

Anmerkung: Zur Beimpfung der Testkultur wird dieses Inokulum einer exponentiell wachsenden Vorkultur entnommen.

3.10 Nährmedium

Wäßrige Lösung von Nährstoffen und Spurenelementen, die für das Algenwachstum notwendig sind (aus: DIN 38 412 Teil 9/05.89).

3.11 Testmedium

Mischung aus Nährmedium und Abwasser.

3.12 In-vivo-Chlorophyll-Fluoreszenz

Fluoreszenzstrahlung, die das Chlorophyll lebender Zellen nach Anregung durch Licht aussendet.

4 Grundlage des Verfahrens

Aus dem Vergleich der Zellvermehrung unter den Versuchsbedingungen mit und ohne Einwirkung des Testguts ergibt sich die Hemmwirkung. Sie ist ein Maß für die Toxizität des Testguts gegenüber dem Testorganismus.

Nach 72stündiger Exposition der Testalgen in den Mischungen wird die Verdünnungsstufe der nicht giftigen Mischung bestimmt, und zwar durch Vergleich der Algenbiomasseproduktion der Testalgen unter Einwirkung des Abwassers mit der Produktion in einer Mischung, die kein Abwasser enthält.

Als Maß für die Algenbiomasse gilt die in-vivo bei Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 685$ nm gemessene Chlorophyll-Fluoreszenz nach Anregung mit Licht im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 500 nm (Maxima bei 435 nm und 485 nm).

5 Störungen

Nicht gelöste Stoffanteile oder Stoffe, die mit der Nährlösung reagieren oder während des Tests ihren Zustand ändern (z.B. durch Ausflocken, biochemischen oder photochemischen Abbau), können das Testergebnis verfälschen und die Reproduzierbarkeit beeinträchtigen. Störende ungelöste Stoffe können in der neutralen Originalprobe durch ein- bis zweistündiges Stehenlassen abgetrennt werden.

Sind Störungen der Fluoreszenzmessung durch Färbung oder Trübung zu erwarten, so wird der Testansatz zur Prüfung der linearen Abhängigkeit der Chlorophyll-Fluoreszenz von der Algenbiomasse mit Verdünnungswasser verdünnt. Durch Wahl der Küvette und der geeigneten Anregungswellenlänge ist sicherzustellen, daß die Fluoreszenz im linearen Bereich gemessen wird.

Ist die Eigenfluoreszenz der Probe größer als die Fluoreszenz einer Algensuspension von $5 \cdot 10^4$ Zellen je ml, so ist dies bei der Auswertung zu berücksichtigen.

6 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zur Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen, Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest, über Verdünnungsstufen (L 33):

Verfahren DIN 38 412 — L 33

7 Geräte

- Lichtthermostat oder thermostatisierter, beleuchteter Raum (Leuchtstofflampen nach DIN EN 60 081, Lichtfarbe: universalweiß²⁾)
- Fluorimeter zur Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz
- Photometer oder Nephelometer zur Einstellung der Zellkonzentration der Einsaat
- Mikroskop zur Kontrolle des Impfmateri als
- Kulturgefäße, z. B. Erlenmeyerkolben, Kulturröhr en oder Standflaschen
- Einrichtung, um die Algen in Suspension zu halten
- Einrichtung zur Messung der Bestrahlungs- oder Beleuchtungsstärke
- Thermometer, z. B. Thermometer DIN 12 775 — E 0,5/0/50
- pH-Meßgerät
- Filtrationsgerät mit Membranfiltern, Porenweite 0,2 µm
- Sterilisator, z. B. nach DIN 58 946 Teil 2
- Meßpipetten, Nennvolumen 10 ml, z. B. Pipette DIN 12 695 — MPAT 10
- Vollpipetten, Nennvolumen 1, 5 und 25 ml, z. B. Pipette DIN 12 691 — VPAS 1

8 Chemikalien

Als Chemikalien werden nur solche des Reinheitsgrades „zur Analyse“, als Wasser, auch als Verdünnungswasser, wird deionisiertes oder Wasser gleichen Reinheitsgrades verwendet.

8.1 Salzsäure, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$

8.2 Natriumhydroxid-Lösung, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$

Anmerkung: Zur Einstellung des pH-Wertes müssen gegebenenfalls stärker verdünnte oder höher konzentrierte Lösungen eingesetzt werden.

8.3 Nährmedium

- Nährmedium aus 3 Einzellösungen herstellen, die bei entsprechender Verdünnung die im Endvolumen der Vorkultur bzw. der Test- und Kontrollansätze einzuhaltenden Konzentrationen ergeben.

²⁾ Über Bezugsquellen gibt Auskunft: Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN, Postfach 11 07, 1000 Berlin 30