

ICS 07.100.20; 13.060.70

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge —
Bio-assays (group L) — Part 48: Toxicity test with *Arthrobacter globiformis* for
contaminated solids (L 48)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux rési-
duaires et des boues — Essais biologiques (groupe L) — Partie 48: Test de l'ef-
fet toxicité avec *Arthrobacter globiformis* pour des matières contaminées (L 48)

Inhalt

	Seite
Vorwort	2
Einleitung	2
1 Anwendungsbereich	2
2 Normative Verweisungen	3
3 Begriffe	3
4 Grundlage des Verfahrens	5
5 Störungen	5
6 Bezeichnung	6
7 Testorganismus	6
8 Stammkultur und Aufbewahrung	6
9 Geräte	7
10 Reagenzien	7
11 Probenvorbereitung	9
12 Durchführung	10
13 Auswertung	11
14 Angabe des Ergebnisses	12
15 Untersuchungsbericht	12
16 Gültigkeitskriterien und Verfahrenskenndaten	12
Anhang A (informativ) Erläuterungen	14
Literaturhinweise	15

Fortsetzung Seite 2 bis 15

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

Vorwort

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

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 A.

Anhang A ist informativ.

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

Der *Arthrobacter globiformis*-Kontakttest erlaubt eine direkte ökotoxikologische Prüfung eines kontaminierten Feststoffes durch die Bestimmung einer Enzymaktivität von Testorganismen, die zusammen mit dem Feststoff inkubiert werden. Es ist ein Kurzzeittest, mit dem innerhalb eines Versuchstages Ergebnisse erhalten werden.

1 Anwendungsbereich

Dieser Test legt ein Verfahren zur Ermittlung der biologischen Wirkung von kontaminierten Feststoffproben in aerober Suspension fest. Der Test kann für die Wirkungsabschätzung gebundener Schadstoffe in der Chemikalienbewertung und für Untersuchungen von Umweltproben (z. B. Sedimente, Schlämme, Schwebstoffe und Bodenmaterial) eingesetzt werden.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

DIN 4220, *Bodenkundliche Standortbeurteilung – Kennzeichnung, Klassifizierung und Ableitung von Bodenkennwerten (normative und nominale Skalierungen)*.

DIN 38415-3:1996-12, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung – Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) – Teil 3: Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser mit dem umu-Test (T 3)*.

DIN EN ISO 1042, *Laborgeräte aus Glas – Messkolben (ISO 1042:1998); Deutsche Fassung EN ISO 1042:1999*.

DIN EN ISO 5667-16, *Wasserbeschaffenheit – Probenahme – Teil 16: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren (ISO 5667-16:1998); Deutsche Fassung EN ISO 5667-16:1998*.

DIN EN ISO 7027, *Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Trübung (ISO 7027:1999); Deutsche Fassung EN ISO 7027:1999*.

DIN EN ISO 10712:1996-02, *Wasserbeschaffenheit – Pseudomonas putida Wachstumshemmtest (Pseudomonas-Zellvermehrungshemmtest) (ISO 10712:1995); Deutsche Fassung EN ISO 10712:1995*.

DIN ISO 1773, *Laborgeräte aus Glas – Erlenmeyer-, Rund- und Stehkolben, enghalsig (ISO 1773:1997)*.

ISO 5667-15:1999, *Water quality – Sampling – Part 15: Guidance on preservation and handling of sludge and sediment samples*.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Dehydrogenaseaktivität

Aktivität wasserstoffabspaltender Enzyme, die in vielen Stoffwechselprozessen (z. B. in der Atmungskette) beteiligt sind und für deren Funktionsfähigkeit die Integrität der Zelle erforderlich ist

3.2

Stammkultur

Kultur eines Bakterienstammes, erhalten aus dem Teststamm eines Laboratoriums, der als Impfmateriel für die Vorkultur im Testverfahren dient

[DIN EN ISO 10712:1996-02]

3.3

Vorkultur

Bakterienkultur zur Adaption der Testbakterien an die Testbedingungen und zur Bereitstellung einer ausreichenden Anzahl von sich exponentiell vermehrenden Bakterien als Inokulum für die Testkultur
[DIN EN ISO 10712:1996-02]

3.4

Inokulum

Bakteriensuspension zum Beimpfen des Nährmediums
[DIN EN ISO 10712:1996-02]

3.5

Nährlösung

wässrige Lösung von Nährstoffen, die für das Bakterienwachstum notwendig sind
[DIN EN ISO 10712:1996-02]

3.6

Kontrollansatz

Gemisch aus Verdünnungswasser, Nährmedium und Inokulum (ohne Testgut)
[DIN EN ISO 10712:1996-02]

ANMERKUNG Um die biologische Wirkung eines kontaminierten Feststoffes zu prüfen, ist es erforderlich, das Material mit einem Kontrollfeststoff zu vergleichen. Dieser Kontrollfeststoff kann auch zur Herstellung von Verdünnungsreihen mit der kontaminierten Probe verwendet werden.

Verschiedene Arten von Kontrollfeststoff können je nach Fragestellung verwendet werden:

- ein inertes Material (z. B. Quarzsand);
- eine künstliche Feststoffmischung (10.7);
- ein zertifizierter natürlicher Boden.

3.7

Testansatz

Mischung aus Nährmedium, Inokulum und Verdünnungsansatz
[DIN 38415-3:1996-12]

ANMERKUNG Es kann auch ohne Verdünnungsansatz untersucht werden.

3.8

Blindansatz

Testansatz oder Kontrollansatz ohne Bakterien, stattdessen mit Testmedium und destilliertem Wasser

3.9

Kontaktzeit

Dauer der Exposition von Bakterien und Feststoffsuspension

3.10

Reaktionszeit

Dauer der Enzymreaktion nach Zugabe des Substrats Resazurin bis zum Abbruch der Reaktion

3.11

Optische Dichte (OD)

Trübungsmessung einer Bakteriensuspension bei 600 nm zur indirekten Bestimmung der Zellzahl

ANMERKUNG Bei einem Testverfahren mit Bakterien wird in der Regel die Extinktion der Messstrahlung bei 600 nm in FAU (Trübungseinheiten Formazin) kalibriert (siehe DIN EN ISO 7027).

3.12

Positivkontrolle

Zugabe von Reagenzien zum Testgut (hier: von Benzalkoniumchlorid zur künstlichen Feststoffmischung (11.2) zur Sensitivitätsprüfung der Testorganismen)

3.13

Konzentrations-Wirkungsbeziehung

Beziehung zwischen gemessener Wirkung und eingesetzter Testgut-Konzentration

ANMERKUNG Die Beziehung wird graphisch dargestellt, indem die Werte für die Hemmwirkung auf der Ordinate gegen die Konzentrationen an Testgut auf der Abszisse aufgetragen werden.

3.14

Effektive Konzentration (EC_x)

Testgut-Konzentration (EC_x), bei der im Vergleich zur Kontrolle ein bestimmtes Quantum (x) an Wirkung (hier: Dehydrogenaseaktivität) zu beobachten ist. Die Effektiven Konzentrationen werden rechnerisch (u. a. Probit-, Logit- und Weibull-Verfahren) aus der Konzentrations-Wirkungsbeziehung ermittelt.

4 Grundlage des Verfahrens

Nach einer definierten Kontaktzeit wird die Hemmung der Stoffwechselaktivität der Testorganismen in der Feststoffsuspension ermittelt. Testkriterium ist die Dehydrogenaseaktivität im Vergleich zu einem Kontrollansatz, gemessen als Resazurinumsatz.

5 Störungen

Ein pH-Wert-Bereich außerhalb 6 bis 9 kann zu einem aktivitätsunabhängigen Farbumschlag des Indikators führen. Deshalb wird der pH-Wert der zu messenden Lösung nach der Reaktionszeit geprüft, ob er innerhalb des angegebenen pH-Bereichs liegt und so die Pufferkapazität von Nährmedium und Resazurin-Lösung ausreicht. Bei einigen Stoffen kommt es in sehr hohen Konzentrationen zu einer Wechselwirkung des Resazurins mit der zu testenden Chemikalie