

DIN 38412-59



ICS 13.060.70

**Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und
Schlammuntersuchung –
Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) –
Teil 59: Algenwachstumshemmtest auf Mikrotiterplatte mit einzelligen
Süßwasser-Grünalgen (L 59)**

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge –
Test methods using water organisms (group L) –
Part 59: Algal growth inhibition test on microplate with unicellular green fresh water
algae (L 59)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des
boues –
Essais biologiques (groupe L) –
Partie 59: Essai d'inhibition de la croissance des algues en microplaque avec des algues
vertes unicellulaires d'eau douce (L 59)

Gesamtumfang 42 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Störungen	8
5 Grundlage des Verfahrens	9
6 Bezeichnung	9
7 Reagenzien, Medien und Verdünnungen	9
8 Testorganismus	13
9 Geräte und Materialien	14
10 Probenvorbereitung	15
11 Durchführung	16
11.1 Herstellung von 10-fach konzentriertem Wachstumsmedium	16
11.2 Herstellung des Wachstumsmediums für die Vorkultur und für das Inokulum	16
11.3 Herstellung der Vorkultur und des Inokulums	17
11.4 Vorbereitung von Testansatz und Kontrolle	17
11.5 Inkubation	19
11.6 Messungen	19
12 Berechnungen	20
12.1 Allgemeines	20
12.2 Berechnung der Wachstumsrate und der prozentualen Hemmung	20
12.3 Berechnung des mittleren Variationskoeffizienten der abschnittswisen spezifischen Wachstumsrate	22
12.4 Berechnung des Variationskoeffizienten der Wachstumsrate in den Kontrollen nach 72 h	22
12.5 Bestimmung von $EC(r)_x$ (z. B. $EC(r)_{10}$ und $EC(r)_{50}$)	23
12.6 Bestimmung der geringsten nicht wirksamen Verdünnung (G-Wert)	23
13 Gültigkeitskriterien	23
14 Angabe der Ergebnisse	24
15 Untersuchungsbericht	24
16 Verfahrenskennndaten	25
Anhang A (informativ) Verfahrenskennndaten	26
Anhang B (informativ) Bezugsquellen für die Testorganismen	28
Anhang C (informativ) Beispiel für die Berechnung von Wachstumsrate und Wachstumsratenhemmung auf einer 24-Well-Mikrotiterplatte und zur Bestimmung der Gültigkeitskriterien	30
C.1 Beispieldaten	30
C.2 Beispiel für die Berechnung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate μ_1 für die Kontrollreplikate (A1 bis A3) nach 72 h (= 3 d) Inkubation [Gleichung (1)]	33
C.3 Beispiel für die Berechnung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate μ_1 für die Positivkontrollreplikate (D1 bis D3) nach 72 h (= 3 d) Inkubation [Gleichung (1)]	34
C.4 Beispiel für die Berechnung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate μ_2 für die Testansatzreplikate (B4 bis B6) nach 72 h (= 3 d) Inkubation [Gleichung (2)]	34
C.5 Beispiel für die Berechnung für die prozentuale Hemmung der Wachstumsrate der Positivkontrolle nach 72 h (= 3 d) Inkubation [Gleichung (3)]	35
C.6 Berechnung der prozentualen Hemmung der Wachstumsrate der Probenverdünnung PV 1 : 2 nach 72 h (= 3 d) Inkubation [Gleichung (3)]	35
C.7 Bestimmung der Gültigkeitskriterien (Abschnitt 13)	36
Anhang D (informativ) Darstellung von Wachstumskurven	39
Anhang E (informativ) Herstellung der Vorkultur	40
Literaturhinweise	41

Tabellen

Tabelle 1 — Konzentration der Nährstoffe in den Stammlösungen und im Testansatz [1]	12
Tabelle 2 — Beispiel für die Zusammensetzung von Blindproben, Kontrollen und Testansätzen auf 24-Well-Mikrotiterplatten	18
Tabelle 3 — Beispiel für die Anordnung von Blindproben, Kontrollen und Testansätzen auf einer 24-Well-Mikrotiterplatte	19
Tabelle A.1 — Ergebnisse des Validierungsringsversuchs für $EC(r)_{50}$ und G -Wert bei Verwendung von Abwasserproben sowie 3,5-Dichlorophenol (3,5-DCP) und Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) für <i>Desmodesmus subspicatus</i>	26
Tabelle A.2 — Ergebnisse des Validierungsringsversuchs für $EC(r)_{50}$ und G -Wert bei Verwendung von Abwasserproben sowie 3,5-Dichlorophenol (3,5-DCP) und Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) für <i>Raphidocelis subcapitata</i>	27
Tabelle C.1 — Anordnung von Blindprobe-, Kontroll- und Testansätzen auf einer 24-Well-Mikrotiterplatte	30
Tabelle C.2 — Fluoreszenzeinheiten nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h Inkubation	31
Tabelle C.3 — Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h Inkubation	32
Tabelle C.4 — Hemmung der spezifischen Wachstumsrate, in %, nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h Inkubation	33
Tabelle C.5 — Abschnittsweise spezifische Wachstumsrate μ_1 für die Kontrollreplikate A1 bis A3 sowie abschnittsweiser Variationskoeffizient $CV\%_R$ und mittlerer Variationskoeffizient $CV\%_{Rm}$	37
Tabelle C.6 — Variationskoeffizient $CV\%_{72h}$ der Wachstumsrate in den Kontrollen A1 bis A3 nach 72 h	38

Vorwort

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

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

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 von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft – Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) – gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung:

Algenwachstumshemmtest auf Mikrotiterplatte mit einzelligen Süßwasser-Grünalgen (L 59).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Telefon 030 2601-2467, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin, Auskunft.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

WARNUNG — Anwender dieses Dokuments sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitgebers, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung der Wachstumshemmung von einzelligen Süßwasser-Grünalgen durch Substanzen und Substanzmischungen in Wasser, durch Abwasser oder durch Umweltproben fest.

Das Verfahren ist anwendbar auf:

- kommunale und industrielle Abwässer;
- Süßwasser (Oberflächenwasser und Grundwasser);
- wässrige Extrakte und Sickerwässer;
- Eluate von Böden und Süßwassersedimenten;
- Porenwasser von Süßwassersedimenten;
- Einzelstoffe und Stoffmischungen, in Wasser gelöst.

Zur Untersuchung der Wirkungen von z. B. schwerlöslichen organischen oder anorganischen Stoffen oder Stoffgemischen, flüchtigen Stoffen, gefärbten und/oder getrübten Proben können bestimmte Modifikationen des festgelegten Verfahrens erforderlich sein. Hinweise zu geeigneten Modifikationen finden sich in ISO 14442:2006 und DIN EN ISO 5667-16:2019-03.

ANMERKUNG Die Elution und Extraktion von Feststoffproben sowie die Aufkonzentrierung von Wasserproben ist nicht Teil dieses Dokuments.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

DIN und DKE stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- DIN-TERMinologieportal: verfügbar unter <https://www.din.de/go/din-term>
- DKE-IEV: verfügbar unter <https://www.dke.de/DKE-IEV>

3.1 Zelldichte

x
Anzahl der Zellen je Volumeneinheit Medium

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Zelldichte wird in Zellen je Milliliter ausgedrückt.

[QUELLE: DIN EN ISO 5667-16:2019-03, 3.2]

3.2 Algenbiomasse

Masse an lebenden Algenzellen in einem bestimmten Volumen

3.3**Verdünnungsstufe****G**

reziproker Wert des Volumenanteils einer Probe in Verdünnungswasser, in dem der Test durchgeführt wird

BEISPIEL 250 ml einer Probe in einem Gesamtvolumen von 1 000 ml (Volumenanteil 25 %) ergibt die Verdünnungsstufe $G = 4$.

Anmerkung 1 zum Begriff: Für eine unverdünnte wässrige Probe beträgt testbedingt die Verdünnung 1 : 1,25 (Endkonzentration der Probe im Test: 80 % Probe). Die korrespondierende Verdünnungsstufe G wird als $G = 1$ bezeichnet.

[QUELLE: DIN EN ISO 15088:2009-06, 3.2, modifiziert – „von Abwasser“ ersetzt durch „einer Probe“; Anmerkung 1 zum Begriff hinzugefügt]

3.4**geringste nicht wirksame Verdünnung****Verdünnungsstufe****G-Wert**

geringste, nicht wirksame untersuchte Verdünnungsstufe G (3.3), angegeben als G -Wert, bei der keine Hemmung oder nur Effekte, die die testspezifische Schwankung nicht überschreiten, beobachtet werden

[QUELLE: DIN EN ISO 15088:2009-06, 3.5]

3.5**Wirkkonzentration** $EC(r)_x$, en: effective concentration

Konzentration der Untersuchungsprobe, die x -%-Hemmung der spezifischen Wachstumsrate, bezogen auf den Kontrollansatz, verursacht

Anmerkung 1 zum Begriff: Der EC -Wert wird auf Basis der spezifischen Wachstumsrate (r) ermittelt.

[QUELLE: DIN EN ISO 10253:2018-08, 3.7, modifiziert – Anmerkung 1 zum Begriff hinzugefügt]

3.6**Wachstumsmedium**

in diesem Test verwendete Kombination von Verdünnungswasser und/oder Nährmedium

[QUELLE: DIN EN ISO 20227:2017-10, 3.4, modifiziert – Anmerkung 1 zum Begriff entfällt]

3.7**Inokulum**

Teil einer Kultur von Testorganismen, die zum Beginn eines Tests oder einer neuen Kultur verwendet wird

3.8**Blindprobe**

Gemisch von Wasser und Nährstoffen ohne den Testorganismus

[QUELLE: DIN EN ISO 5667-16:2019-03, 3.1]

3.9**Kontrolle**

Wachstumsmedium einschließlich der Organismen, die im Test eingesetzt werden, ohne das Testgut

[QUELLE: DIN EN ISO 5667-16:2019-03, 3.3, modifiziert – „oder Kontrollsediment“ gestrichen, „Kontroll“ ersetzt durch „Wachstums“]

3.10

Positivkontrolle

gut beschriebene Referenzsubstanz, die, wenn nach einem bestimmten Testverfahren bewertet, die Eignung des Testsystems zur Erzielung einer reproduzierbaren, in geeignetem Maße positiven oder reaktiven Antwort im Testsystem nachweist

[QUELLE: DIN EN ISO 10993-12:2021-08, 3.11, modifiziert – „beliebiges“ vor „gut beschriebenes“ gestrichen; „Material und/oder Substanz, das/die“ ersetzt durch „Referenzsubstanz, die“; „Prüf“ ersetzt durch „Test“]

3.11

Vorkultur

Kultur von Organismen, die unter Bedingungen gezüchtet werden, die ihre Anpassung an die Testbedingungen fördern

[QUELLE: DIN ISO 6107-6:2017-11, 61, modifiziert – „als Teilschritt in der Herstellung eines Inokulums für einen bestimmten Test, wie Genotoxizitätstests“ entfällt]

3.12

Probe

Anteil eines Materials, der aus einer größeren Menge dieses Materials ausgewählt wurde

[QUELLE: DIN EN 15863:2015-06, 3.10]

3.13

Testansatz

Testmedium und Organismen, die für die Untersuchung verwendet werden

[QUELLE: DIN EN ISO 20079:2006-12, 3.22]

3.14

spezifische Wachstumsrate

μ
proportionale Zunahmerate der Zelldichte je Zeiteinheit

$$\mu = \frac{1}{n} \frac{d_n}{d_t}$$

Dabei ist

n die Zelldichte, ausgedrückt in Zellen je Milliliter;

t die Zeit in Tagen.

Anmerkung 1 zum Begriff: Die spezifische Wachstumsrate wird umgekehrt proportional in Tagen angegeben (Tag^{-1}).

[QUELLE: ISO/TR 11044:2008, 3.2, modifiziert – Anmerkung 2 zum Begriff entfällt]

4 Störungen

Flüchtige Substanzen könnten das Algenwachstum in anderen Wells der Mikrotiterplatte, z. B. in den Wells mit den Kontrollen, hemmen. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen müssen Testansätze von Proben mit flüchtigen Inhaltsstoffen voneinander isoliert werden, z. B. durch Verwendung separater Mikrotiterplatten.

Auch ohne direkte toxische Wirkungen können gefärbte und/oder trübe Proben das Algenwachstum durch Abschattung oder durch Herausfiltern einer bestimmten, für Algen wesentlichen Wellenlänge, negativ beeinflussen. Außerdem können gefärbte und/oder trübe Proben zu einem Fluoreszenzverlust durch Lichtabsorption oder Lichtstreuung führen. Eine Probenbehandlung zur Verringerung der Trübung (Abschnitt 10) kann die

Störungen durch Trübung kompensieren. Die Untersuchung von gefärbten Lösungen kann spezifische Modifikationen erfordern, wie z. B. in ISO 14442:2006 beschrieben.

Das Untersuchungsergebnis kann durch eine hohe Hintergrund-Algendichte in der Probe beeinflusst werden. Zudem können zusätzliche Nährstoffe in der Probe ein verstärktes Algenwachstum im Testansatz im Vergleich zur Kontrolle bewirken und dadurch das Untersuchungsergebnis beeinflussen. Ein verstärktes Algenwachstum durch Nährstoffe in der Probe kann die Wachstumshemmung durch toxische Verbindungen überdecken.

Ein hoher Salzgehalt in der Probe kann das Algenwachstum aufgrund des osmotischen Drucks hemmen und zu einer Ausfällung von Mineralsalzen im Wachstumsmedium führen.

Eine Probenfiltration vor der Testdurchführung kann die Toxizität der Probe erheblich verringern.

Ungelöste Verbindungen in der Probe oder Substanzen, die während der Testdurchführung mit dem Wachstumsmedium reagieren oder ihren Zustand verändern (z. B. durch Ausfällung oder Flockung, biochemischen oder photochemischen Abbau), können das Testergebnis verfälschen und die Reproduzierbarkeit beeinträchtigen.

Algenagglutinationen, die auf eine schlechte Qualität der Algenkultur oder auf die Probe zurückzuführen sind, können die Fluoreszenzmessung stören und zu einer hohen Variabilität zwischen den Replikaten führen. Deshalb sollten die Testansätze vor der Messung immer durchmischt werden, um während der Messung eine homogene Verteilung der Algenzellen sicherzustellen.

Elektronische Partikelzählgeräte dürfen verwendet werden. Dabei ist zu beachten, dass diese nicht zwischen lebenden und toten Zellen und Partikeln unterscheiden können.

Manche Proben können eine messbare Eigenfluoreszenz bei Anregungswellenlängen im Bereich zwischen 400 nm und 500 nm (Maxima bei 435 nm und 485 nm) aufweisen. Die Eigenfluoreszenz der Probe und ihrer Verdünnungen muss bei der Auswertung des Tests berücksichtigt werden. Bei der Berechnung der Wachstumsraten ist daher Gleichung (2) anzuwenden. Bei der Auswertung nach diesem Dokument wird die Eigenfluoreszenz der Proben zum Zeitpunkt des Testansatzes berücksichtigt. Bei manchen Proben kann sich die Eigenfluoreszenz über den Testverlauf ändern und dadurch das Testergebnis beeinträchtigen.

5 Grundlage des Verfahrens

Exponentiell wachsende einzellige Algenarten werden für eine festgelegte Zeitspanne unterschiedlichen Konzentrationen der Probe ausgesetzt. Die Testansätze werden über einen Zeitraum von (72 ± 1) h inkubiert, innerhalb dessen die Zelldichte jedes Testansatzes mindestens alle 24 h gemessen wird. Die Hemmung wird als eine Verringerung der Wachstumsrate der Algen in dem Testansatz im Verhältnis zur Wachstumsrate der Algen in der Kontrolle unter identischen Wachstumsbedingungen bestimmt. Zur Berechnung der Wachstumsrate wird die Algenbiomasse indirekt über die Messung der *in-vivo*-Chlorophyll-Fluoreszenz bestimmt. Eine mögliche Eigenfluoreszenz der Probe wird bei der Berechnung berücksichtigt.

6 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zum Algenwachstumshemmtest auf Mikrotiterplatte mit einzelligen Süßwasser-Grünalgen (L 59):

Verfahren DIN 38412 — L 59

7 Reagenzien, Medien und Verdünnungen

7.1 Allgemeines

Soweit möglich, Chemikalien des Reinheitsgrads „zur Analyse“ verwenden.

Bei der Herstellung der Nährstoff-Stammlösungen sowie von Stamm- und Testkulturen Geräte und Verfahren einsetzen, die eine sterile Algenkultur sicherstellen. Die Sterilisation von Lösungen und Medien erfolgt durch Sterilfiltration (9.1), (9.10) oder durch 20-minütiges Autoklavieren bei $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$. Zum Autoklavieren werden die Gefäße nur lose abgedeckt (z. B. mit Aluminiumfolie). Die Gefäße dürfen nicht luftdicht verschlossen werden.

Geräte aus Kupfer dürfen nicht verwendet werden.

7.2 Wasser, deionisiert oder von vergleichbarer Reinheit (Leitfähigkeit $< 10 \mu\text{S}/\text{cm}$), zur Herstellung des Nährmediums und der Lösungen von Testsubstanzen.

7.3 Agar.

7.4 Ammoniumchlorid, NH_4Cl . CAS-RN: 12125-02-09.

7.5 Borsäure, H_3BO_3 . CAS-RN: 10043-35-3.

7.6 Calciumchlorid-Dihydrat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. CAS-RN: 10035-04-8.

7.7 Kobaltdichlorid-Hexahydrat, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. CAS-RN: 7791-13-1.

7.8 Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. CAS-RN: 10125-13-0.

7.9 Dimethylsulfoxid, DMSO, $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$. CAS-RN: 67-68-5.

7.10 Dikaliumhydrogenphosphat (dibasisches Kaliumphosphat), K_2HPO_4 . CAS-RN: 7758-11-4.

7.11 Dinatriummethylenediamintetraessigsäure (EDTA)-Dihydrat. CAS-RN: 6381-92-6 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (EDTA, Ethylenediamintetraessigsäure $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$).

7.12 Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. CAS-RN: 10025-77-1.

7.13 Salzsäure, HCl , z. B. $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$. CAS-RN: 7647-01-0.

7.14 Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. CAS-RN: 7791-18-6.

7.15 Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. CAS-RN: 10034-99-8.

7.16 Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. CAS-RN: 13446-34-9.

7.17 Kaliumdihydrogenphosphat (einbasiges Kaliumphosphat), KH_2PO_4 . CAS-RN: 7778-77-0.

7.18 Natriummolybdat-Dihydrat, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. CAS-RN: 10102-40-6.

7.19 Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3 . CAS-RN: 144-55-8.

7.20 Natriumhydroxidlösung, NaOH , z. B. $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$. CAS-RN: 1310-73-2.

7.21 Zinkchlorid, ZnCl_2 . CAS-RN: 7646-85-7.

7.22 Nährstoff-Stammlösungen.

Die Nährstoffkonzentrationen in den Stammlösungen (7.22.1 bis 7.22.5) und im Testansatz sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

7.22.1 Stammlösung 1: Nährsalze

1,5 g NH_4Cl (7.4); 1,2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7.14); 1,8 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.6) und 1,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (7.15) in 1 000 ml Wasser (7.2) lösen. Die Lösung durch Filtration (9.1), (9.10) oder durch Autoklavieren (7.1) sterilisieren. Die Lösung im Dunkeln bei (2 bis 8) °C nicht länger als sechs Monate lagern.

7.22.2 Stammlösung 2: Phosphatpuffer

18,15 g KH_2PO_4 (7.17) und 11,67 g K_2HPO_4 (7.10) in 1 000 ml Wasser (7.2) lösen. Die Lösung durch Filtration (9.1), (9.10) oder durch Autoklavieren (7.1) sterilisieren. Die Lösung im Dunkeln bei (2 bis 8) °C nicht länger als sechs Monate lagern.

7.22.3 Stammlösung 3: Eisenkomplex

64 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7.12) und 100 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.11) in 1 000 ml Wasser (7.2) lösen. Die Lösung durch Filtration (9.1), (9.10) oder durch Autoklavieren (7.1) sterilisieren. Die Lösung im Dunkeln bei (2 bis 8) °C nicht länger als sechs Monate lagern.

7.22.4 Stammlösung 4: Spurenelemente

185 mg H_3BO_3 (7.5); 415 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (7.16); 3 mg ZnCl_2 (7.21); 1,5 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7.7); 0,01 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.8) und 7 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.18) in 1 000 ml Wasser (7.2) lösen. Die Lösung durch Filtration (9.1), (9.10) sterilisieren. Die Lösung im Dunkeln bei (2 bis 8) °C nicht länger als sechs Monate lagern.

Zur leichteren Handhabung wird empfohlen, jeweils eine wässrige Lösung von 3 000 mg/l ZnCl_2 (7.21), von 1 500 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7.7), von 10 mg/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.8) und eine Lösung von 7 000 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.18) herzustellen. Von jeder Lösung wird 1 ml zu 1 000 ml einer wässrigen Lösung von 185 mg/l H_3BO_3 (7.5) und 415 mg/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (7.16) gegeben, um die Endkonzentration von 3 mg/l ZnCl_2 (7.21), 1,5 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7.7), 0,01 mg/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.8) und 7 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.18) zu erreichen.

ANMERKUNG Die Abweichung vom Gesamtvolumen um 0,4 % (1 000 ml + 4 ml) kann dabei vernachlässigt werden.

Die resultierende Lösung durch Filtration (9.1), (9.10) sterilisieren. Die Lösung im Dunkeln bei (2 bis 8) °C nicht länger als sechs Monate lagern.

7.22.5 Stammlösung 5: Bikarbonat

Stammlösung 5 unmittelbar vor der Verwendung herstellen.

0,5 g NaHCO_3 (7.19) in 10 ml Wasser (7.2) lösen. Die Lösung durch Filtration (9.1), (9.10) sterilisieren.

Tabelle 1 — Konzentration der Nährstoffe in den Stammlösungen und im Testansatz [1]

Stammlösung	Molare Masse M	Konzentration in der Stammlösung	Verdünnung	Konzentration im Testansatz	
1: Nährsalze (7.22.1)	—	g/l	1 : 100	mg/l	mmol/l
NH ₄ Cl (7.4)	53,49	1,5	—	15	0,283
MgCl ₂ · 6H ₂ O (7.14)	203,30	1,2	—	12	0,06
CaCl ₂ · 2H ₂ O (7.6)	147,02	1,8	—	18	0,12
MgSO ₄ · 7H ₂ O (7.15)	246,48	1,5	—	15	0,06
2: Phosphatpuffer (7.22.2)	—	mg/l	1 : 100	mg/l	mmol/l
KH ₂ PO ₄ (7.17)	136,09	18 150	—	181,5	1,33
K ₂ HPO ₄ (7.10)	174,18	11 670	—	116,7	0,67
3: Eisen-Komplex (7.22.3)	—	mg/l	1 : 1 000	µg/l	µmol/l
FeCl ₃ · 6H ₂ O (7.12)	270,33	64	—	64	0,24
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O (7.11)	372,24	100	—	100	0,27
4: Spurenelemente (7.22.4)	—	mg/l	1 : 1 000	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃ (7.5)	61,83	185	—	185	3
MnCl ₂ · 4H ₂ O (7.16)	197,91	415	—	415	2,1
ZnCl ₂ (7.21)	136,28	3	—	3	0,022
CoCl ₂ · 6H ₂ O (7.7)	237,93	1,5	—	1,5	0,006 3
CuCl ₂ · 2H ₂ O (7.8)	170,48	0,01	—	0,01	0,000 059
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O (7.18)	241,95	7	—	7	0,029
5: Bikarbonat (7.22.5)	—	g/l	1 : 1 000	mg/l	mmol/l
NaHCO ₃ (7.19)	84,01	50	—	50	0,6

7.23 Referenzsubstanzen.

7.23.1 3,5-Dichlorphenol, C₆H₄Cl₂O, Reinheit ≥ 99 %. CAS-RN: 591-35-5.

Lösung A: 23 mg 3,5-Dichlorphenol in 10 ml DMSO (7.9) auflösen.

Lösung B: 300 µl der Lösung A in 100 ml Wasser (7.2) geben.

Die Endkonzentration von 3,5-Dichlorphenol in Lösung B beträgt 6,9 mg/l.

Für den Test ist Lösung B zu verwenden (siehe Positivkontrolle in Tabelle 2).

Die Endkonzentration von 3,5-Dichlorphenol im Testansatz beträgt 2,1 mg/l.

Lösung A darf bei ≤ -18 °C bis zu zwei Jahre gelagert werden.

Lösung B darf bei ≤ -18 °C bis zu einem Jahr gelagert werden.

ANMERKUNG Bewährt hat sich, 1,5 ml Aliquote der Lösung B in Kryogegefäße (9.6) oder Reaktionsgefäße (9.14) abzufüllen, einzufrieren und die erforderliche Anzahl an Aliquoten am Tag des Tests aufzutauen.

7.23.2 Kaliumdichromat, K₂Cr₂O₇, CAS-RN: 7778-50-9.

Lösung C: 27 mg Kaliumdichromat in 100 ml Wasser (7.2) lösen.

Lösung D: 1 000 µl der Lösung C in 100 ml Wasser (7.2) zugeben.

Die Endkonzentration von Kaliumdichromat in Lösung D beträgt 2,7 mg/l.

Für den Test ist Lösung D zu verwenden (siehe Positivkontrolle in Tabelle 2).

Die Endkonzentration von Kaliumdichromat im Testansatz beträgt 0,8 mg/l.

Lösung C darf bei $\leq -18^\circ\text{C}$ bis zu zwei Jahre gelagert werden.

Lösung D darf bei $\leq -18^\circ\text{C}$ bis zu zwei Jahre gelagert werden.

ANMERKUNG 1 Bewährt hat sich, 1,5 ml Aliquote der Lösung B in Kryogefäße (9.6) oder Reaktionsgefäße (9.14) abzufüllen, einzufrieren und die erforderliche Anzahl an Aliquoten am Tag des Tests aufzutauen.

ANMERKUNG 2 Da $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ eine giftige, krebserregende Substanz ist, kann zur Herstellung der Lösung für den Test durch Verwendung einer im Handel erhältlichen Lösung mit definierter $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Konzentration (Titrisol®)¹ das Risiko des Einatmens von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Staub vermieden werden.

Berechnungsbeispiel für die Herstellung der Lösung D mit 2,7 mg/l $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ aus einer im Handel erhältlichen Titer-Stammlösung (1/60 mol/l $\approx 4\,903\text{ mg/l}$):

Die Titer-Stammlösung (1/60 mol/l $\approx 4\,903\text{ mg/l}$) nach Angaben der Hersteller in 1 l Wasser (7.2) ansetzen. 10 ml dieser Titer-Stammlösung in einen Messkolben mit Wasser (7.2) geben und mit Wasser (7.2) auf 100 ml auffüllen (490,3 mg/l $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Davon 5,5 ml in einem Messkolben mit Wasser (7.2) geben und mit Wasser (7.2) auf 1 000 ml auffüllen, um Lösung D mit einer Konzentration von 2,7 mg/l $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ für den Einsatz im Test (Tabelle 2) zu erhalten.

8 Testorganismus

Für das Testverfahren eine der folgenden planktischen Süßwasseralgenarten verwenden:

- a) *Desmodesmus subspicatus*² (UTEX 2594, CCAP 276/22, SAG 86.81);
- b) *Raphidocelis subcapitata*³ (ATCC 22662, UTEX 1648, CCAP 278/4 oder SAG 61.81).

Beide Arten zeigen möglicherweise nicht die gleichen Reaktionen auf toxische Inhaltsstoffe von Proben.

Wegen möglicher Unsicherheiten in der Taxonomie der Algenarten ist es notwendig, definierte und verifizierte Stämme zu verwenden.

Eine Liste mit Adressen potentieller Bezugsquellen für die Testorganismen ist in Anhang B enthalten.

ANMERKUNG 1 Beide Algenarten sind planktische Grünalgen, die zur Ordnung der *Chlorococcales* (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*) gehören. Unter Kulturbedingungen wachsen sie üblicherweise einzellig.

1 Titrisol® ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch DIN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

2 Diese Art wurde früher als *Scenedesmus subspicatus* Chodat bezeichnet.

3 Diese Art wurde früher als *Selenastrum capricornutum* Prinz und *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak bezeichnet.