

DIN EN ISO 11348-1



ICS 13.060.70

Ersatz für
DIN EN ISO 11348-1:1999-04

**Wasserbeschaffenheit –
Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die
Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) –
Teil 1: Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien (ISO 11348-1:2007);
Deutsche Fassung EN ISO 11348-1:2008**

Water quality –
Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of
Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) –
Part 1: Method using freshly prepared bacteria (ISO 11348-1:2007);
German version EN ISO 11348-1:2008

Qualité de l'eau –
Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de
Vibrio fischeri (Essai de bactéries luminescentes) –
Partie 1: Méthode utilisant des bactéries fraîchement préparées (ISO 11348-1:2007);
Version allemande EN ISO 11348-1:2008

Gesamtumfang 36 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Diese Norm ist Bestandteil der Reihe

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

und beschreibt das Verfahren

Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) — Teil 1: Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien (L 51).

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 11348-1:2008) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water Quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der NA 119-01-03-05-01 AK „Biotests“ im NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Diese Norm wurde für die Anwendung im Rahmen der Umsetzung der Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik¹⁾ entwickelt.

In der Reihe ISO 11348 existieren folgende Teile, unter dem Haupttitel *Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test)*:

- *Part 1: Method using freshly prepared bacteria*
- *Part 2: Method using liquid-dried bacteria*
- *Part 3: Method using freeze-dried bacteria.*

Bezeichnung des Verfahrens Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) — Teil 1: Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien (L 51):

Verfahren DIN EN ISO 11348-1 — L 51

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

1) Nachgewiesen in der DITR-Datenbank der DIN Software GmbH, zu beziehen bei: Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin.

Alle für die Abwasserverordnung (AbwV) nach § 7a des Gesetzes zur Ordnung des Wasserhaushaltes (Wasserhaushaltsgesetz — WHG) über „Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer“ relevanten Einheitsverfahren sind zusammen mit der AbwV und dem WHG als Loseblattsammlung „Analyseverfahren in der Abwasserverordnung — Rechtsvorschriften und Normen“ (Ergänzungsbände) von der Beuth Verlag GmbH herausgegeben worden.

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

Allgemeine Angaben (Gruppe A)	(DIN 38402)
Sensorische Verfahren (Gruppe B)	(DIN 38403)
Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)	(DIN 38404)
Anionen (Gruppe D)	(DIN 38405)
Kationen (Gruppe E)	(DIN 38406)
Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)	(DIN 38407)
Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)	(DIN 38408)
Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)	(DIN 38409)
Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)	(DIN 38410)
Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)	(DIN 38411)
Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)	(DIN 38412)
Einzelkomponenten (Gruppe P)	(DIN 38413)
Schlamm und Sedimente (Gruppe S)	(DIN 38414)
Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)	(DIN 38415)

Außer den in der Reihe DIN 38402 bis DIN 38415 genormten Untersuchungsverfahren liegen eine Reihe Europäischer und Internationaler Normen als DIN-EN-, DIN-EN-ISO- und DIN-ISO-Normen vor, die ebenfalls Bestandteil der „Deutschen Einheitsverfahren“ sind.

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Telefon 030 2601–2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 5667-16	siehe DIN EN ISO 5667-16
ISO 5814	siehe DIN EN 25814
ISO 7027	siehe DIN EN ISO 7027
ISO 10253	siehe DIN EN ISO 10253

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 11348-1: 1999-04 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Anwendungsbereich des Verfahrens wurde erweitert um
 - Meerwasser,
 - Eluate von Sedimenten (Süßwasser, Brackwasser und Meerwasser),
 - Einzelstoffe, in Wasser gelöst;
- b) weitere Hinweise zu Störungen wurden aufgenommen:
 - Ersatz der Konzentrationsangabe für hemmende, leicht abbaubare Nährstoffe nach Literaturhinweis [1],
 - Störungen durch extreme pH-Werte,
 - Stimulation des Leuchtens durch Meerwasser als mögliche Störung bei der Untersuchung von meerwasserhaltigen Proben ist zu beachten;
- c) Reagenzien und Materialien
 - die Angabe der Bezugsquelle für Leuchtbakterien wurde aufgenommen,
 - die zu testenden 3,5-Dichlorphenol-Referenzsubstanz-**Konzentration** wurde **geändert** und der Reinheitsgrad festgeschrieben,
 - ein Hinweis auf Zulässigkeit der Verwendung von fertigen Referenzsubstanzlösungen wurde aufgenommen;
- d) Änderungen hinsichtlich der Vorbereitung des Verfahrens:
 - der **zulässige Temperaturbereich** während der Untersuchung wurde von $\pm 0,2\text{ °C}$ auf **0,3 °C** erhöht,
 - Probenahme: die **Lagerdauer** tiefgekühlter Proben von 2 Wochen wurde auf **2 Monate** ausgedehnt,
 - Probenvorbehandlung: **Ermittlung des Sauerstoffgehalts aller Proben nach ISO 5814** und Belüftung bei Sauerstoffkonzentrationen $< 3\text{ mg/l}$,
 - Herstellung der Vorkultur: **Inkubationsdauer** der Vorkultur wurde auf **3 Tage** verkürzt,
 - Herstellung der Vorratssuspension: Korrektur des **Aliquotierungsvolumens** der Bakteriensuspension, statt 100 l **100 µl**,
 - das Tiefgefrieren der Vorratssuspension vor Verwendung im Test ist obligatorisch und ihre potentielle Lagerdauer wurde ausgedehnt;
- e) Änderungen hinsichtlich der Durchführung des Verfahrens:
 - Festlegung auf Testung von **2 Parallelansätzen**,
 - Korrektur der Herstellung der Testsuspension durch **Einfügen eines Zwischenverdünnungsschrittes**;
- f) weiteres Verfahren zur Berechnung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen z. B. nach ISO/TS 20281 wurde aufgenommen,
- g) Änderungen hinsichtlich der Gültigkeitskriterien: die zulässige **Obergrenze** für den $\overline{f}_{kr}$ -Wert wurde **auf 1,3 gesenkt**;
- h) im Anhang B wurden die Volumina der Test- und Kontrollansätze verändert und die Probenvorbereitung graphisch dargestellt;
- i) **Anhang D** zur Untersuchung von Meerwasserproben wurde **neu** aufgenommen;
- j) die Norm wurde redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN 38412-34: 1991-03, 1997-07

DIN EN ISO 11348-1: 1999-04

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN EN 25814, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung des gelösten Sauerstoffs — Elektrochemisches Verfahren*

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

DIN EN ISO 7027, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Trübung*

DIN EN ISO 10253, *Wasserbeschaffenheit — Wachstumshemmtest mit marinen Algen Skeletonema costatum und Phaeodactylum tricornutum*

— Leerseite —

Deutsche Fassung

**Wasserbeschaffenheit —
Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf
die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) —
Teil 1: Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien
(ISO 11348-1:2007)**

Water quality —
Determination of the inhibitory effect of water samples on
the light emission of *Vibrio fischeri*
(Luminescent bacteria test) —
Part 1: Method using freshly prepared bacteria
(ISO 11348-1:2007)

Qualité de l'eau —
Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons
d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri*
(Essai de bactéries luminescentes) —
Partie 1: Méthode utilisant des bactéries
fraîchement préparées
(ISO 11348-1:2007)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 29. Oktober 2008 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B- 1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen.....	5
3 Grundlagen des Verfahrens.....	5
4 Störungen	6
5 Reagenzien und Materialien	6
6 Geräte.....	8
7 Probenahme und Probenvorbehandlung.....	9
7.1 Probenahme	9
7.2 Probenvorbehandlung	9
8 Herstellung der Leuchtbakterienkulturen	10
8.1 Vorratskulturen	10
8.2 Herstellung der Vorkulturen	10
8.3 Herstellung der Hauptkultur	10
8.4 Herstellung der Vorratssuspension	10
9 Durchführung	11
10 Auswertung	13
10.1 Hemmwirkung auf die Leuchtbakterien	13
10.2 Ermittlung der EC-Werte	14
11 Angabe der Ergebnisse.....	15
12 Gültigkeitskriterien	17
13 Präzision	17
14 Untersuchungsbericht	17
Anhang A (informativ) Verfahren zur Farbkorrektur	18
Anhang B (informativ) Verdünnungsstufe G — Herstellung der Verdünnungsreihe	21
Anhang C (informativ) Verfahrenskennndaten	25
Anhang D (informativ) Untersuchung von Meerwasserproben im Leuchtbakterientest mit frisch gezüchteten Bakterien	26
Literaturhinweise	30

Vorwort

Der Text von ISO 11348-1:2007 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water Quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 11348-1:2008 durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 2009, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2009 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 11348-1:1998.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 11348-1:2007 wurde vom CEN als EN ISO 11348-1:2008 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Einleitung

Nach der Reihe ISO 11348 kann die Messung mit frisch gezüchteten, gefriergetrockneten oder flüssig getrockneten Bakterien durchgeführt werden.

Vom Normenausschuss Wasserwesen im DIN und der ISO/TC 147/SC 5/WG 1 durchgeführte standardisierte Untersuchungen unter Bedingungen dieser Norm haben gezeigt, dass diese unterschiedlichen Verfahren in bestimmten Fällen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können, insbesondere wenn die Wasserproben Schwermetalle enthalten.

Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Verfahren ist die Folge der unterschiedlichen Beschaffenheit der Kulturmedien, die zur Bereitung gefriergetrockneter und flüssig getrockneter Bakterien eingesetzt werden. Diese verschiedenen Kulturmedien beeinflussen die Bioverfügbarkeit von toxischen Stoffen und/oder die Lichtemission der Leuchtbakterien. Das bedeutet, dass die Ergebnisse der Untersuchungen unter Berücksichtigung der Herkunft der Bakterien und der Art der Herstellung der Medien interpretiert werden müssen. Ein Problem kann daraus resultieren, dass gefriergetrocknete und flüssig getrocknete Bakterien von unterschiedlichen Lieferanten bezogen werden können. Für die Anwendung kann das bedeuten, dass die Zusammensetzung der Medien nicht im Detail bekannt ist bzw. nicht nachvollzogen werden kann.

Deshalb wird in diesem Teil von ISO 11348 zusätzlich zur Toxizitätsbestimmung mit flüssig getrockneten Bakterien (ISO 11348-2) und mit gefriergetrockneten Bakterien (ISO 11348-3) ein Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien beschrieben, dessen Durchführung in allen Einzelheiten vom Anwender nachvollzogen werden kann.

Die für die Untersuchungsergebnisse verantwortlichen Laboratorien haben so die Möglichkeit, das Verfahren auszuwählen, das, unter Berücksichtigung ihres Sachverstandes und der über die Wasserprobe zur Verfügung stehenden Informationen, am besten geeignet ist.

WARNUNG — Anwender dieses Teils von ISO 11348 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.

WICHTIG — Es ist erforderlich, bei Untersuchungen nach diesem Teil von ISO 11348 Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Die Reihe ISO 11348 legt drei Verfahren zur Bestimmung der Hemmung der Lichtemission des marinen Bakteriums *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177) fest. Dieser Teil von ISO 11348 beschreibt ein Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien.

Das Verfahren gilt für:

- Abwasser;
- wässrige Extrakte und Sickerwasser;
- Süßwasser (Oberflächenwasser und Grundwasser);
- Meerwasser und Brackwasser;
- Eluate von Sedimenten (Süßwasser, Brackwasser und Meerwasser);
- Porenwasser;
- Einzelstoffe, in Wasser gelöst.

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).

ISO 5667-16, *Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on biotesting of samples*

ISO 5814, *Water quality — Determination of dissolved oxygen — Electrochemical probe method*

ISO 7027, *Water quality — Determination of turbidity*

3 Grundlagen des Verfahrens

Die Hemmung der Lichtemission von *Vibrio fischeri* wird in einem Batch-Test ermittelt. Hierzu werden definierte Volumina der Probe oder einer verdünnten Probe mit der Leuchtbakteriensuspension in einer Küvette vereinigt.

Testkriterium ist die Abnahme der Lumineszenz, die nach einer Kontaktzeit von 15 min oder 30 min oder wahlweise nach 5 min gemessen wird. Hierbei muss ein Korrekturfaktor (f_{kr}) berücksichtigt werden, der ein Maß für die Leuchtintensitätsveränderung im Kontrollansatz während der Kontaktzeit darstellt. Die Hemmwirkung der Wasserprobe kann anhand von Verdünnungsreihen als G_{1b} (siehe Anhang B) oder als EC_{20} - und/oder EC_{50} -Wert ermittelt werden.