

DIN EN ISO 20079



ICS 13.060.70

**Wasserbeschaffenheit –
Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und
Abwasser gegenüber Wasserlinsen (*Lemna minor*) –
Wasserlinsen-Wachstumshemmtest (ISO 20079:2005);
Deutsche Fassung EN ISO 20079:2006**

Water quality –

Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed
(*Lemna minor*) –

Duckweed growth inhibition test (ISO 20079:2005);

German version EN ISO 20079:2006

Qualité de l'eau –

Détermination de l'effet toxique des constituants de l'eau et des eaux résiduaires vis-à-vis
des lentilles d'eau (*Lemna minor*) –

Essai d'inhibition de la croissance des lentilles d'eau (ISO 20079:2005);

Version allemande EN ISO 20079:2006

Gesamtumfang 38 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 toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und
Abwasser gegenüber Wasserlinsen (*Lemna minor*) — Wasserlinsen-
Wachstumshemmtest (L 49).

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (DIN EN ISO 20079:2006) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Wasserbeschaffenheit“ 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“ des NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Diese Norm wurde für die 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.

Für die Durchführung des Verfahrens im nationalen Anwendungsbereich ist ausschließlich das *modifizierte STEINBERG*-Medium zu benutzen.

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 Loseblatt-Sammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam vom Beuth Verlag GmbH und von dem Wiley-VCH Verlag publiziert.

Alle für die Abwasserverordnung (AbwV) — enthalten in der neuen Verordnung zu § 7a des Gesetzes zur Ordnung des Wasserhaushaltes (WHG) über „Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer und zur Anpassung des Abwasserabgabengesetzes“ — relevanten Einheitsverfahren sind zusammen

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

mit der AbwV und dem WHG und allen noch fortgeltenden Abwasserverwaltungsvorschriften als Loseblattsammlung „Analyseverfahren in der Abwasserverordnung — Rechtsvorschriften und Normen“ mit dem Ergänzungsband 1 (DIN-Normen), Ergänzungsband 2 (DIN-EN- und DIN-EN-ISO-Normen) und dem Ergänzungsband 3 (DIN-, DIN-EN- und DIN-EN-ISO-Normen) 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 Internationaler und Europäischer 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 10260	siehe DIN 38412-16
ISO/IEC 17025	siehe DIN EN ISO/IEC 17025

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

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

DIN 38412-16, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) — Teil 16: Bestimmung des Chlorophyll-a-Gehaltes von Oberflächenwasser (L 16)*

DIN EN ISO/IEC 17025, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*

Deutsche Fassung

Wasserbeschaffenheit —
Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und
Abwasser gegenüber Wasserlinsen (*Lemna minor*) —
Wasserlinsen-Wachstumshemmtest (ISO 20079:2005)

Water quality — Determination of the toxic effect of water
constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*)
— Duckweed growth inhibition test (ISO 20079:2005)

Qualité de l'eau — Détermination de l'effet toxique des
constituants de l'eau et des eaux résiduaires vis-à-vis des
lentilles d'eau (*Lemna minor*) — Essai d'inhibition de la
croissance des lentilles d'eau (ISO 20079:2005)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 17. August 2006 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 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, 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 Begriffe	5
4 Grundlage des Verfahrens	8
5 Störungen	8
6 Geräte	8
7 Reagenzien	9
8 Testorganismen	12
9 Stamm- und Vorkulturen	12
10 Durchführung	13
11 Gültigkeitskriterien	17
12 Angabe der Ergebnisse	17
13 Berechnung der $EC(r)_x$ Werte für die Frondanzahl und den zweiten Beobachtungsparameter	19
14 Angabe der Ergebnisse	19
15 Verfahrenskennndaten	19
16 Untersuchungsbericht	20
Anhang A (informativ) Herstellung der Nährmedien	22
Anhang B (informativ) Bestimmung des LID-Wertes für Abwasser — ein vereinfachtes Verfahren zur Abwasserprüfung	28
Anhang C (informativ) Bezugsquellen für <i>Lemna minor</i>	32
Literaturhinweise	33

Vorwort

Der Text von ISO 20079:2005 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Wasserbeschaffenheit“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 20079:2006 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 März 2007, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis März 2007 zurückgezogen werden.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, 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 20079:2005 wurde vom CEN als EN ISO 20079:2006 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Einleitung

Die Wasserlinse *Lemna minor* dient als Modellorganismus für höhere Wasserpflanzen. Wasserlinsen sind monokotyle, frei auf dem Wasser treibende Angiospermen und werden innerhalb der Unterklasse der *Arecidae* den *Arales* zugeordnet. Wasserlinsen sind sehr schnell wachsende höhere Pflanzen, die in stehenden Gewässern von den Tropen über die gemäßigten bis in die arktische Zone weltweit verbreitet sind. In ihrer ökologischen Funktion steht diese Art als Primärproduzent am Anfang der Nahrungskette für Wasservögel, Fische und Kleintiere. Außerdem dient sie vielen kleinen Wirbellosen als Substrat und Habitat.

Wasserlinsen können durch Wasserinhaltsstoffe und Abwasser (siehe Anhang B) geschädigt werden. Die daraus resultierende Wachstumshemmung wird auf der Basis von Beobachtungsparametern (Frondanzahl, Frondfläche, Chlorophyll, Trockenmasse) mithilfe einer Reihe definierter Berechnungsverfahren ermittelt.

Für die Berechnung toxischer Effekte durch Wasserinhaltsstoffe (z. B. Chemikalien, Pflanzenbehandlungsmittel) werden EC-Werte ermittelt. Es werden mindestens zwei Beobachtungsparameter auf der Basis der mittleren spezifischen Wachstumsraten ausgewertet.

Das Verfahren wurde für die Messung der Reaktion auf in Wasser gelöste Substanzen entwickelt. Dies beinhaltet die Definition einer festgelegten Verdünnungsstufe oder Konzentration einer Probe, bei der ein Beobachtungsparameter (Endpunkt) zu einem definierten Prozentsatz gegenüber der Kontrolle gehemmt worden ist.

WARNUNG — Anwender dieser Internationalen Norm sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Norm erhebt nicht den Anspruch, alle — falls vorhanden — sicherheitsrelevanten Aspekte abzudecken, die mit deren Anwendung verbunden sind. Es liegt in der Verantwortung der Anwender, geeignete Maßnahmen und Vorgehensweisen für Gesundheits- und Arbeitssicherheit festzulegen. Die Einhaltung jeweils geltender, nationaler Vorschriften ist sicherzustellen.

WICHTIG — Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Internationalen Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt die Bestimmung der wachstumshemmenden Wirkung von im Wasser enthaltenen Substanzen und Gemischen sowie von behandelten kommunalen und industriellen Abwässern auf Wasserlinsen (*Lemna minor*) fest.

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 10260, *Water quality — Measurement of biochemical parameters — Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

axenische Kulturen

Monokulturen von Organismen einer Art, frei von Pilzen, Algen und anderen Makrophytenarten

3.2

Auswerteparameter

Parameter zur Bestimmung der Toxizität, die durch verschiedene Berechnungsverfahren für einen der Beobachtungsparameter ermittelt werden

BEISPIEL Wachstumsraten auf Basis der Frondanzahl, der Frondfläche, des Chlorophyllgehaltes und der Trockenmasse sind in dieser Internationalen Norm Auswerteparameter.

3.3

Chlorose

Verlust von Pigment (Vergilbung) der Fronds

3.4

Kolonie

Aggregation von miteinander verbundenen Mutter- und Tochterfronds, gelegentlich als Pflanze bezeichnet

3.5

Kontrollansatz

Kontrollmedium, einschließlich der für die Untersuchung verwendeten Organismen

3.6

Kontrollmedium

Mischung aus Verdünnungswasser und/oder Nährmedium, das im Test verwendet wird

3.7

Verdünnungswasser

Wasser, welches zur Untersuchungsprobe hinzugegeben wird, um eine Serie definierter Verdünnungen herzustellen

3.8

Verdopplungszeit

Quotient aus dem natürlichen Logarithmus von 2 ($\ln 2$) und der mittleren spezifischen Wachstumsrate

3.9

effektive Konzentration

Konzentration einer Untersuchungsprobe (EC_x), bei der im Vergleich zur Kontrolle eine Hemmung des Wachstums von x % ermittelt wurde

ANMERKUNG Um einen auf Basis der Wachstumsrate ermittelten EC-Wert eindeutig zu bezeichnen, wird vorgeschlagen, das Symbol „EC(r)“ zu verwenden, dem in Klammern der in Bezug genommene Beobachtungsparameter angefügt wird, z. B. EC(r) (Fronanzahl).

3.10

Frond

individuelle blattanaloge Struktur einer Wasserlinsenkolonie; kleinste vermehrungsfähige Einheit (Individuum)

3.11

Frondfläche

senkrecht von oben sichtbare Gesamtfläche aller Fronds

3.12

Fronanzahl

Gesamtzahl aller Fronds, einschließlich derer, die von oben sichtbar unter einem Mutterfrond hervorgeschoben ohne Vergrößerungshilfe sichtbar sind

3.13

Wachstum

zeitabhängige Zunahme der Biomasse als Ergebnis der Ausbildung neuen Gewebes

ANMERKUNG In diesem Verfahren bezieht sich das Wachstum auf jeden Beobachtungsparameter.

3.14

Wachstumsrate

Auswerteparameter, definiert als Quotient aus der Differenz der natürlichen Logarithmen eines Beobachtungsparameters und der dazugehörigen Zeitspanne

ANMERKUNG Umfasst die Wachstumsrate die gesamte Testdauer, kann dies als mittlere Wachstumsrate bezeichnet werden. Zwischen einzelnen Messzeitpunkten wird die Wachstumsrate als abschnittsweise Wachstumsrate bezeichnet (siehe 12.1.2).

3.15

Inokulum

zum Testbeginn in den jeweiligen Testansätzen eingesetzte Anzahl von Fronds (Kolonien)

3.16

Nekrose

Tod von Frondgewebe, erkennbar durch weiße und braune Färbung

3.17

Nährmedium

wässrige Lösung von Nährstoffen und Spurenelementen, die für das Wachstum der Wasserlinsen notwendig sind

3.18

Beobachtungsparameter

qualitative und quantitative Biomasseparameter (Frondanzahl, Gesamtfondfläche, Chlorophyllgehalt und Trockenmasse), die am Testorganismus einmalig oder mehrfach festgestellt werden können

ANMERKUNG Diese Parameter (Frondanzahl, Gesamtfondfläche, Chlorophyllgehalt und Trockenmasse) sind für die Bewertung von Wachstum und Vitalität des Testorganismus relevant.

3.19

Vorkultur

Wasserlinsenkultur, die zur Adaption der Testpflanzen an die Testbedingungen und zur Anzucht des Inokulums verwendet wird

3.20

Wurzel

Teil einer Wasserlinsen-Pflanze, die wurzelanaloge Struktur aufweist

3.21

Stammkultur

Kultur einer Wasserlinsenart zur Bewahrung des ursprünglich definierten *Lemna*-Teststammes im Labor und zur Bereitstellung von Impfmateriail für die Vorkultur

ANMERKUNG Aufgrund möglicher Unsicherheiten bei der Artbestimmung ist es notwendig, definierte und geprüfte Stämme zu verwenden. Liste von Bezugsquellen, siehe Anhang C.

3.22

Testansatz

Testmedium und Organismen, die für die Untersuchung verwendet werden

3.23

Testmedium

Kombination aus Untersuchungsprobe, Verdünnungswasser und Nährmedium, wie es im Test verwendet wird

3.24

Untersuchungsprobe

festgelegter Teil einer Probe (Oberflächenwasser, Abwasser, gelöste Einzelchemikalien oder Mischungen, Produkte und Formulierungen), die entsprechend den Anforderungen nach diesem Verfahren vorbehandelt wurden (z. B. Homogenisierung, Filtern, Neutralisierung)

4 Grundlage des Verfahrens

Pflanzen der Wasserlinsenart *Lemna minor* wachsen über einen Zeitraum von sieben Tagen als Monokulturen in verschiedenen Konzentrationen einer Untersuchungsprobe. Ziel der Untersuchungen ist die Quantifizierung substanzabhängiger Effekte auf das vegetative Wachstum während des Untersuchungszeitraumes. Grundlage hierfür sind die Bestimmung der Frondanzahl und auch von Biomasseparametern (Frondfläche, Chlorophyllgehalt, Trockenmasse). Zur Quantifizierung substanzabhängiger Effekte wird die Wachstumsrate in den Testansätzen mit derjenigen des Kontrollansatzes verglichen. Dabei wird die Konzentration ermittelt, bei der eine definierte prozentuale Wachstumshemmung (x %) vorliegt und als $EC(r)_x$ angegeben wird.

5 Störungen

Nicht gelöste, schwer lösliche oder flüchtige Stoffanteile oder Stoffe, die mit dem Verdünnungswasser oder dem Nährmedium reagieren oder während des Tests ihren physikalisch-chemischen Zustand ändern, können das Testergebnis beeinflussen und/oder die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse beeinträchtigen (siehe ISO 5667-16). Besonders zu berücksichtigen sind im Wasserlinsentest auch Stoffe, die sich in Oberflächenfilmen anreichern und deshalb verstärkt Wirkungen auf Wasserlinsen verursachen können.

6 Geräte

Anforderungen an die Geräteausstattung werden durch die Gestaltung der Testdurchführung vorgegeben.

6.1 Zylindrische Glasgefäße (Bechergläser, Kristallisierschalen, Petrischalen) mit einem Mindestvolumen von 150 ml (2/3 des Gesamtvolumens für Testlösungen, z. B. 100 ml).

6.2 Einheitliche Abdeckungen aus Glas

Um zufällige Kontaminationen zu vermeiden und Verdunstungsverluste zu minimieren, können Abdeckungen verwendet werden.