

DIN EN ISO 20227



ICS 13.060.70

**Wasserbeschaffenheit –
Bestimmung der wachstumshemmenden Wirkung von Abwässern,
natürlichen Wässern und Chemikalien auf die Wasserlinsenart
Spirodela polyrhiza –
Verfahren mittels Stammkultur unabhängigem mikrobiologischem Test
(ISO 20227:2017);
Deutsche Fassung EN ISO 20227:2017**

Water quality –
Determination of the growth inhibition effects of waste waters, natural waters and chemicals
on the duckweed *Spirodela polyrhiza* –
Method using a stock culture independent microbiotest (ISO 20227:2017);
German version EN ISO 20227:2017

Qualité de l'eau –
Détermination des effets d'inhibition sur la croissance de la lentille d'eau *Spirodela polyrhiza*
par les eaux usées, les eaux naturelles et les produits chimiques –
Méthode utilisant un bioessai miniaturisé indépendant d'une culture mère (ISO 20227:2017);
Version allemande EN ISO 20227:2017

Gesamtumfang 28 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 20227:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

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

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5667-16	siehe	DIN EN ISO 5667-16
ISO 5725-1:1994/Technical Corrigendum 1:1998	siehe	DIN ISO 5725-1:1997-11 und DIN ISO 5725-1 Berichtigung 1:1998-09
ISO 5725-2:1994/Technical Corrigendum 1:2002	siehe	DIN ISO 5725-2:2002-12
ISO 20079	siehe	DIN EN ISO 20079

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

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

DIN ISO 5725-1:1997-11, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe (ISO 5725-1:1994)*

DIN ISO 5725-1 Berichtigung 1:1998-09, *Berichtigungen zu DIN ISO 5725-1:1997-11 (ISO 5725-1:1994/Cor. 1:1998)*

DIN ISO 5725-2:2002-12, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:1994 einschließlich Technisches Korrigendum 1:2002)*

Deutsche Fassung

Wasserbeschaffenheit —
Bestimmung der wachstumshemmenden Wirkung
von Abwässern, natürlichen Wässern und Chemikalien
auf die Wasserlinsenart *Spirodela polyrhiza* —
Verfahren mittels Stammkultur unabhängigem
mikrobiologischem Test
(ISO 20227:2017)

Water quality —
Determination of the growth inhibition effects
of waste waters, natural waters and chemicals
on the duckweed *Spirodela polyrhiza* —
Method using a stock culture independent
microbiotest
(ISO 20227:2017)

Qualité de l'eau —
Détermination des effets d'inhibition sur la croissance
de la lentille d'eau *Spirodela polyrhiza* par les eaux
usées, les eaux naturelles et les produits chimiques —
Méthode utilisant un bioessai miniaturisé indépendant
d'une culture mère
(ISO 20227:2017)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 9. Mai 2017 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 CEN-CENELEC-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, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Grundlage des Verfahrens	8
5 Testorganismen	8
6 Wachstumsmedium	9
6.1 Herstellung von Stammlösungen	9
6.2 Herstellung der finalen Konzentration des modifizierten Steinberg-Mediums	10
7 Geräte	10
8 Referenzchemikalien	10
9 Durchführung	11
9.1 Keimung der <i>Spirodela polyrhiza</i> -Turionen	11
9.2 Abwassertests	11
9.2.1 Zugabe von konzentriertem Wachstumsmedium zur Abwasserprobe	11
9.2.2 Herstellung der Abwasserverdünnungen	12
9.2.3 Durchführung	12
9.3 Tests der chemischen Verbindungen	13
9.3.1 Bereichsfeststellungstest	13
9.3.2 Definitiver Test	14
9.4 Füllen der Testplatte mit den giftigen Verdünnungen	15
9.4.1 Allgemeines	15
9.4.2 Durchführung	15
9.5 Übertragen der gekeimten Turionen in die Testnapfchen	15
9.6 Photo der Mikrotiterplatte zu Beginn des Toxizitätstests	16
9.7 Inkubation der Mikrotiterplatte	16
9.8 Photo der Mikrotiterplatte am Ende des Toxizitätstests	16
9.9 Messung der Fläche der ersten Fronds	16
10 Datenbearbeitung – Berechnung der Wachstumshemmung	17
11 Gültigkeitskriterien	18
12 Testempfindlichkeit	18
13 Test mit Referenzchemikalien	18
14 Untersuchungsbericht	20
Anhang A (informativ) Stammkultivierung von <i>Spirodela polyrhiza</i> für die Turionenherstellung	21
Anhang B (informativ) Empfindlichkeit des Mikrobiotests mit <i>Spirodela polyrhiza</i>	22
Anhang C (informativ) Verfahrenskenndaten	25
Literaturhinweise	26

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 20227:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Januar 2018, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Januar 2018 zurückgezogen werden.

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

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 20227:2017 wurde von CEN als EN ISO 20227:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen, sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147, *Water quality*, Unterkomitee SC 5, *Biological methods*, erarbeitet.

Einleitung

Wasserlinsen sind freischwebende höhere Wasserpflanzen, die häufig in der ökotoxikologischen Forschung zur Beurteilung der Toxizität von Abwasser, natürlichen Gewässern und Chemikalien verwendet werden (siehe ISO 20079 und [6] bis [11] sowie [12] speziell für Pflanzenschutzmittel).

Bei Wasserlinsen handelt es sich um schnell wachsende Pflanzen, von denen viele weltweit verbreitet sind. Dadurch sind sie gut als Primärproduzenten zur Gefährdungsbeurteilung von Schadstoffen in Süßwasserumgebungen geeignet.

Im Gegensatz zu Erdpflanzen, bei denen die Biotests bereits während des „ruhenden“ Lebensstadiums (Keimlinge) begonnen werden können, sind für Toxizitätsprüfungen mit Wasserlinsen eine ständige Kultivierung und Pflege des Lebendstämme nötig, einschließlich der damit verbundenen biologischen, technischen und finanziellen Aufwendungen.

Einige Wasserlinsenarten jedoch produzieren „ruhende vegetative Knospen“ (Turionen), die für lange Zeit gelagert werden können und welche zum Zeitpunkt der Durchführung des Biotests „auf Abruf“ keimen können.

Bei einer der turionenproduzierenden Wasserlinsen handelt es sich um *Spirodela polyrhiza*. Diese Art wurde letztlich für einen einfachen und praktischen Mikrobiotest ausgewählt, welcher unabhängig von der Stammkultivierung und Pflege des Lebendstammes ist.

Es wurde festgestellt, dass *Spirodela polyrhiza* genauso empfindlich auf Giftstoffe reagiert wie die konventionellen Biotests mit Wasserlinsen.

Das Mikrobiotestverfahren in diesem Dokument beinhaltet eine dreitägige Keimung der Turionen mit anschließendem dreitägigen Toxizitätstest auf einer Mikrotiterplatte, wobei die Bestimmung der Wachstumshemmung der ersten Fronds per Bildanalyse erfolgt.

Der Mikrobiotest mit *Spirodela polyrhiza* ist sehr einfach und leicht durchzuführen:

- a) für den Biotest ist keine Kultivierung oder Pflege von Lebendstämmen der Testarten nötig und er kann durch Verwendung von gelagerten Turionen „zu jeder Zeit und überall“ durchgeführt werden;
- b) gelagerte Turionen erzielen selbst nach mehreren Monaten in Lagerung einen großen Keimungserfolg;
- c) für den Mikrobiotest werden wenig Arbeitsfläche und Inkubationsplatz sowie wenig Ausrüstung benötigt;
- d) Flächenmessungen der ersten Fronds brauchen nicht sofort erfolgen und können auf eine geeignete Zeit verschoben werden;
- e) die Flächenmessungen durch Bildanalyse erfolgen sehr schnell und genau und dauern für einen kompletten Test weniger als eine Stunde.

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, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

WICHTIG — Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach diesem Dokument Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung der Wachstumshemmung der ersten Fronds von aus Turionen gekeimten *Spirodela polyrhiza* durch Substanzen und Substanzmischungen in Wasser oder Abwasser einschließlich behandeltem kommunalen Abwasser und industriellem Abwasser fest.

Der Test ist auch für reine Chemikalien und insbesondere für Pflanzenschutzmittel und Pestizide geeignet.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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

— IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>

— ISO Online browsing platform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

EC_x

Konzentration der Untersuchungsprobe, die x-%-Wirkung im Vergleich zur Kontrolle verursacht

3.2

Frond

blattanaloge Struktur, welche sich aus einem gekeimten Turion entwickelt

3.3

Wachstum

zeitabhängige Zunahme der Biomasse als Ergebnis der Ausbildung neuen Gewebes

Anmerkung 1 zum Begriff: In diesem Verfahren bezieht sich die Zunahme der Größe des ersten aus einem gekeimten Turion entwickelten Fronds.

3.4

Wachstumsmedium

in diesem Test verwendete Kombination von Verdünnungswasser und/oder Nährmedium

Anmerkung 1 zum Begriff: In diesem Test ist damit das Nährmedium, welches für die Keimung der Turionen und das Wachstum der Fronds verwendet wird, gemeint.

3.5

Inokulum

Übertragen eines gekeimten Turions mit seinem kleinen Frond in alle Näpfchen zu Beginn des Toxizitätstests

3.6

Reinwasser

deionisiertes oder destilliertes Wasser mit einer hydraulischen Leitfähigkeit von unter 10 µS/cm

[QUELLE: ISO 19827:2016, 3.4]

3.7

Wurzel

Teil der Pflanze *Spirodela polyrhiza*, der eine wurzelähnliche Struktur annimmt und sich unter dem Frond entwickelt

3.8

Stammkultur

Kultur einer einzelnen Art der Wasserlinse zur Herstellung des Turions

3.9

Testmedium

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

[QUELLE: ISO 20079:2005, 3.23]

3.10

Testgut

einzelne Portion der Probe (d. h. entnommen von Vorfluter, Abwasser, gelösten chemischen Stoffen oder Mischungen, Produkten und Verbindungen) vorbehandelt nach den Anforderungen dieses Tests (z. B. Verdünnung, Filtration, Neutralisation)

3.11

Turion

kleine vegetative Knospe, welche sich aus einer Wasserlinsenkolonie unter bestimmten Umgebungsbedingungen entwickelt.