

DIN ISO 10872



ICS 13.060.70

Wasserbeschaffenheit –**Bestimmung der toxischen Wirkung von Sediment- und Bodenproben auf Wachstum, Fertilität und Reproduktion von *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) (ISO 10872:2010)**

Water quality –

Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) (ISO 10872:2010)

Qualité de l'eau –

Détermination de l'effet toxique d'échantillons de sédiment et de sol sur la croissance, la fertilité et la reproduction de *Caenorhabditis elegans* (Nematodes) (ISO 10872:2010)

Gesamtumfang 25 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Inhalt

Seite

Nationales Vorwort	3
Einleitung.....	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Grundlage des Verfahrens	9
5 Reagenzien	9
6 Geräte.....	12
7 Referenzsubstanz	13
8 Organismen	13
8.1 Testorganismus	13
8.2 Futterorganismus	13
9 Stamm- und Vorkulturen	14
9.1 Stammkulturen.....	14
9.1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	14
9.1.2 <i>Escherichia coli</i>	14
9.2 Vorkulturen.....	14
10 Durchführung.....	15
10.1 Vorbereitung des Futtermediums	15
10.2 Vorbereitung des Testmaterials und der Kontrollen.....	15
10.2.1 Sediment, Boden und Abfall.....	15
10.2.2 Porenwasser, Eluat, Extrakt	16
10.2.3 Lösung der Referenzsubstanz	16
10.3 Test.....	16
10.4 Abtrennung der Nematoden	16
10.5 Messungen und Berechnungen	17
10.5.1 Wiederfindung.....	17
10.5.2 Männchen	17
10.5.3 Wachstum und Fertilität.....	17
10.5.4 Reproduktion.....	18
10.6 Zeitlicher Ablauf des Tests	20
11 Gültigkeitskriterien	20
12 Angabe der Ergebnisse.....	21
13 Untersuchungsbericht	21
Anhang A (informativ) Bilder adulter Würmer <i>C. elegans</i>	22
Anhang B (informativ) Verfahrenskennndaten	23
Literaturhinweise	25

Nationales Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird. Für Deutschland war der Arbeitskreis NA 119-01-03-05-01 AK „Biotests“ im Arbeitsausschuss NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN an der Bearbeitung beteiligt.

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 Wasserpolitik^{*)} entwickelt.

Angesichts der ökologischen Bedeutung freilebender nicht-parasitärer Nematoden für den Erhalt der Bodenfunktionen ist mit dem Prüfverfahren an *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) eine Lücke in der Testbatterie genormter chronischer Prüfverfahren für die biologische Charakterisierung von Böden oder Bodensubstraten geschlossen worden, auch wenn das Verfahren Teil der Wasserqualitätsprüfung ist. Da der Lebensraum dieser Art sowohl Süßwassersedimente als auch den wassergesättigten Porenraum von Böden umfasst, konnte anhand einer breiten Palette unterschiedlich belasteter Böden gezeigt werden, dass das Prüfverfahren geeignet ist, toxische Eigenschaften kontaminierter Böden aufzuzeigen (Höss et al. 2009).

Die Prüfung von Böden mit möglichem toxischem Potential erfolgt allgemein über den Vergleich mit einem Kontrollboden, der keine Wirkung auf den Testorganismus ausübt. Gerade bei längerfristigen subletalen Prüfverfahren ist es aber schwierig, einen geeigneten Kontrollboden zu definieren, da die Prüfparameter wie z. B. Wachstum und Reproduktion nicht nur von Stoffen anthropogener Herkunft, sondern auch von den standorttypischen Bodeneigenschaften beeinflusst sein können. In der Folge sorgt die erhöhte Variabilität der Prüfparameter für Unschärfe bei der ursächlichen Zuordnung der Wirkungen.

Bei dem vorstehenden Prüfverfahren mit *C. elegans* ist beispielsweise zu berücksichtigen, dass Tonanteil und Humusbestandteile in Böden Wachstum und Reproduktion direkt (Höss et al., 1999, 2001; Steinberg et al., 2002) oder indirekt über die Bioverfügbarkeit organischer Verunreinigungen beeinflussen können (Haitzer et al., 1998). Häufig ist es sinnvoll, Standardböden (z. B. LUFA 2.2)^{**)} , deren Auswirkungen auf die Prüfparameter bekannt sein sollten, in die Untersuchung mit einzubeziehen. Für LUFA 2.2 als einen von insgesamt 9 untersuchten Kontrollböden leiten Höss et al., 2009, auf Grund der beobachteten prüfungsinherenten Variabilität hinnehmbare Hemmungen von 2 % bzw. 34 % für Wachstum und Reproduktion ab. Für die Gesamtheit der einbezogenen 9 unkontaminierten Kontrollböden werden für die Endpunkte Wachstum und Reproduktion hinnehmbare Hemmungen von 10 % bzw. 40 % abgeleitet. Dem wenig beeinflussten Endpunkt Fertilität wurde analog zum Validitätskriterium eine tolerable Abweichung von 20 % zugeordnet. Derartige testspezifische Unsicherheitsbereiche sind jedoch für biologische Prüfverfahren nicht ungewöhnlich und schmälern die Eignung des Verfahrens nicht.

Die von Höss et al., 2009, beschriebenen Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, dass die an *C. elegans* beobachteten toxischen Auswirkungen nicht mit jenen anderer Verfahren aus der „Testbatterie“ der Bodenqualitätsprüfung (Regenwürmer, Collembolen, höhere Pflanzen) korrelierten. Unabhängig davon, welchem Umstand diese Beobachtung zuzuschreiben ist, lässt sich daraus ableiten, dass dieses Prüfverfahren eine sinnvolle Ergänzung zu den bestehenden Verfahren darstellt.

Es wird wie bei anderen Verfahren auch, späterer Verfahrensüberarbeitungen vorbehalten bleiben, ergänzende bodenprüfungsrelevante Hinweise für die Versuchsdurchführung und die Ergebnisinterpretation auf der Basis einer gewachsenen Prüferfahrung zu geben.

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

**) Zu beziehen bei: Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer, stdboden@lufa-speyer.de

Diese Norm ist Bestandteil der Reihe

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L).

Bezeichnung des Verfahrens:

Bestimmung der toxischen Wirkung von Sediment- und Bodenproben auf Wachstum, Fertilität und Reproduktion von *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) (L 55):

Verfahren DIN ISO 10872 — L 55

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 7027	siehe DIN EN ISO 7027
ISO 10390	siehe DIN ISO 10390
ISO 10523	siehe DIN EN ISO 10523
ISO 11465	siehe DIN ISO 11465

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.

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

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.

Alle für die Abwasserverordnung (AbwV^{***}) nach § 57, Absatz 1, Nummer 1 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 „Analysenverfahren 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.

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

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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 10523, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung des pH-Werts*

DIN ISO 10390, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des pH-Wertes*

DIN ISO 11465, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Trockensubstanz und des Wassergehalts auf Grundlage der Masse — Gravimetrisches Verfahren*

Haitzer, M., Höss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C.E.W., 1998. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms — a review. *Chemosphere* 37, pp. 1335-1362

Höss, S., Haitzer, M., Traunspurger, W., Steinberg, C.E.W., 1999. Growth and fertility of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in unpolluted freshwater sediments — response to particlesize distribution and organic content. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, pp. 2921-2925

Höss, S., Bergtold, M., Haitzer, M., Traunspurger, W., Steinberg, C.E.W. 2001 Refractory dissolved organic matter can influence the reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). *Freshw. Biol.* 46, pp. 1-10

Höss, S., Jänsch, S., Moser, T., Junker, T., Römbke, J., 2009. Assessing the toxicity of contaminated soils using the nematode *Caenorhabditis elegans* as test organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, pp. 1811-1818

Steinberg, C.E.W., Höss, S., Brüggemann, R., 2002. Further evidence that humic substances have the potential to modulate the reproduction of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int. Rev. Hydrobiol.* 87, pp. 121-133

Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der toxischen Wirkung von Sediment- und Bodenproben auf Wachstum, Fertilität und Reproduktion von *Caenorhabditis elegans* (Nematoda)

Einleitung

Nematoden sind die individuen- und artenreichste Organismengruppe der Metazoen in Sedimenten und Böden [1], [2] und spielen eine wichtige Rolle in bentischen Nahrungsnetzen und Bodennahrungsnetzen [3], [4]. Nematoden sind endobenthische Organismen, die sich durch die Evolution verschiedener Ernährungstypen (Bakterien- und Algenfresser, Omnivore, Räuber) in mehreren trophischen Ebenen wieder finden.

Der Testorganismus *Caenorhabditis elegans* (Maupas, N2 var. Bristol) ist eine bakterienfressende Nematodenart, die natürlicher Weise vor allem in terrestrischen Böden, aber auch in aquatischen Sedimenten polysaprobe Süßwassersysteme vorkommt [5], [6]. *C. elegans* ist ein gut untersuchter und sehr einfach zu kultivierender Organismus [7].

Der Aufbau der Prüfung ermöglicht die Untersuchung der Reaktion auf gelöste und partikelgebundene Substanzen [8], [9], [10]. Er findet Anwendung für die Untersuchung von Sedimenten, Böden, Abfall, Porenwasser, Eluaten und wässrigen Extrakten.

WARNUNG — Anwender dieser Internationalen Norm sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Internationale 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 den Untersuchungen nach dieser Internationalen Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung der Toxizität von Umweltproben auf Wachstum, Fertilität und Reproduktion von *Caenorhabditis elegans* fest. Das Verfahren kann sowohl für Süßwassersediment (maximale Salinität 5 ‰), Böden, Abfall, als auch für Porenwasser, Eluate und wässrige Extrakte verwendet werden, die aus kontaminierten Sedimenten, Böden und Abfall extrahiert wurden.

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 7027, *Water Quality — Determination of turbidity*

ISO 10390, *Soil quality — Determination of pH*

ISO 10523, *Water quality — Determination of pH*

ISO 11465, *Soil quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Agarplatte

Petrischale, gefüllt mit NGM-agar (5.8)

3.2

Wasserkontrolle

Wasser, das als Negativkontrolle für Tests in wässrigen Proben dient

3.3

künstliches Kontrollsediment

definiertes künstliches Sediment (5.12)

3.4

Bakterienstammkultur

Stammkultur der Futterbakterien

3.5

Leer-Replik

zusätzliches Replik, das keine Testorganismen enthält, aber genauso wie die anderen Replikate der Probe behandelt wird

3.6

Kontrolle

Behandlung, die als Negativkontrolle dient und mit einer Wirkung in einem Testmaterial verglichen wird (3.2, 3.3, 3.7)

3.7

Kontrollboden

definierter Standardboden (5.13)