

DIN EN ISO 10253



ICS 13.060.70

Entwurf

Einsprüche bis 2023-05-17
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 10253:2018-08

**Wasserbeschaffenheit –
Wachstumshemmtest mit marinen Algen *Skeletonema* sp. und
Phaeodactylum tricornutum (ISO/DIS 10253:2023);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 10253:2023**

Water quality –

Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema* sp. and *Phaeodactylum tricornutum* (ISO/DIS 10253:2023);

German and English version prEN ISO 10253:2023

Qualité de l'eau –

Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema* sp. et *Phaeodactylum tricornutum* (ISO/DIS 10253:2023);

Version allemande et anglaise prEN ISO 10253:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-03-17 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an naw@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 71 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 10253:2023) 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 nationale Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 119-01-03-05-03 AK „Marine Biotests“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Bezeichnung des Verfahrens:

Wachstumshemmtest mit marinen Algen *Skeletonema* sp. und *Phaeodactylum tricornutum* (L 45)

Verfahren DIN EN ISO 10253-L 45

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

IEC 60081	siehe	DIN EN 60081
ISO 5667-16	siehe	DIN EN ISO 5667-16
ISO 8692:2012	siehe	DIN EN ISO 8692:2012-06

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

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 Schlammuntersuchung:

Wachstumshemmtest mit marinen Algen *Skeletonema* sp. und *Phaeodactylum tricornutum* (L 45).

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 Schlammuntersuchung“ 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 Schlammuntersuchung“ 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 2601–2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin, Auskunft.

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 10253:2018-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) in 5.2, Tabelle 2, wurde K_3PO_4 durch K_2HPO_4 in der Stammlösung 3 ersetzt;
- b) Anhang D wurde um die Beschreibung des marinen Algen-Wachstumshemmtests mit *Phaeodactylum tri-cornutum* in 24-Well-Mikrotiterplatten ergänzt;
- c) die Norm wurde redaktionell überarbeitet.

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN EN 60081, *Zweiseitig gesockelte Leuchtstofflampen — Anforderungen an die Arbeitsweise*

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

DIN EN ISO 8692:2012-06, *Wasserbeschaffenheit — Süßwasseralgen-Wachstumshemmtest mit einzelligen Grünalgen (ISO 8692:2012); Deutsche Fassung EN ISO 8692:2012*

Wasserbeschaffenheit – Wachstumshemmtest mit marinen Algen *Skeletonema* sp. und *Phaeodactylum tricornutum* (ISO/DIS 10253:2023)

Water quality – Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema* sp. and *Phaeodactylum tricornutum* (ISO/DIS 10253:2023)

Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema* sp. et *Phaeodactylum tricornutum* (ISO/DIS 10253:2023)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Vorwort	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Grundlage des Verfahrens	8
5 Arbeitsmittel	9
5.1 Testorganismen	9
5.2 Reagenzien	10
5.2.1 Wasser	10
5.2.2 Synthetisches Meerwasser	10
5.2.3 Nährstoffe	11
6 Geräte	11
7 Durchführung	12
7.1 Herstellung des Nährmediums	12
7.2 Herstellung der Vorkultur und des Inokulums	12
7.3 Wahl der Testkonzentrationen	13
7.4 Herstellung der Testsubstanz-Stammlösungen	13
7.5 Herstellung der Test- und Kontrollansätze	13
7.6 Inkubation	14
7.7 Messungen	14
8 Gültigkeitskriterien	14
9 Auswertung der Daten	15
9.1 Auftragen von Wachstumskurven	15
9.2 Berechnung der prozentualen Hemmung	15
9.3 Bestimmung von $EC(r)_X$	16
10 Angabe der Ergebnisse	16
11 Auswertung der Ergebnisse	16
12 Untersuchungsbericht	16
Anhang A (informativ) Herstellung von Verdünnungsreihen von Proben in Meerwasser (Abwässer oder Eluate)	18
A.1 Allgemeines	18
A.2 Herstellung eines konzentrierten Nährmediums	18
A.3 Herstellung einer Verdünnungsreihe der Testmedien	18
Anhang B (informativ) Auf gelagerten Algen-Inokula beruhende Testverfahren mit direkter Messung des Algenwachstums in Spektralphotometer-Küvetten	20
B.1 Allgemeines	20
B.2 Grundlage des Verfahrens	20
B.3 Materialien	20
B.3.1 Testorganismen	20
B.3.2 Nährstoffe	20
B.3.3 Algen-Inokulum	20
B.4 Geräte	21
B.5 Laborausrüstung	21
B.6 Durchführung des Tests	21
B.6.1 Vorkultivieren der Algen	21
B.6.2 Bestimmung des Verhältnisses „optische Dichte (OD) und Algenanzahl (N)“ für spektralphotometrische Messungen in Lang-Küvetten	22
B.6.3 Herstellung des konzentrierten Algen-Inokulums	22
B.6.4 Herstellung einer Verdünnungsreihe für die Prüfung von giftigen Substanzen	23
B.6.5 Umfüllen der für Algen giftigen Lösungen in Test-Lang-Küvetten	23

B.6.6	Inkubation der Testgefäße	23
B.6.7	Messungen	24
B.6.8	Tests mit gefärbten, natürlichen Proben	24
B.6.9	Messung des pH-Werts	24
B.7	Berechnung der prozentualen Hemmung	24
B.8	Gültigkeitskriterien	24
B.9	Präzision	24
B.10	Untersuchungsbericht	26
Anhang C	(informativ) Verfahrenskenndaten	27
Anhang D	(informativ) Mariner Algen-Wachstumshemmtest mit <i>Phaeodactylum tricornutum</i> in 24-Well-Mikrotiterplatten	28
D.1	Allgemeines	28
D.2	Grundlage des Verfahrens	28
D.3	Material	29
D.3.1	Testorganismus	29
D.3.2	Referenzsubstanz	29
D.3.3	Labormaterial	29
D.4	Geräte	29
D.4.1	Mikrotiterplatten-Fluorometer	29
D.4.2	Orbitalschüttler für Mikrotiterplatten	29
D.5	Durchführung	29
D.5.1	Herstellung des Nährmediums	29
D.5.2	Herstellung eines konzentrierten Nährmediums	29
D.5.3	Vorkultivierung der Algen und des Inokulums	30
D.5.4	Vorbereitung der Verdünnungsreihen der Testsubstanz	30
D.5.5	Versuchsaufbau – Anzahl der Mikrotiterplatten und Belegung der Wells	30
D.5.6	Vorbereitung der Test- und Kontrollansätze	31
D.5.7	Vorbereitung der Inkubation	32
D.5.8	Messungen und Inkubation	33
D.6	Berechnung der prozentualen Hemmung	34
D.7	Gültigkeitskriterien	34
D.8	Untersuchungsbericht	34
D.9	Verfahrenskenndaten	34
Literaturhinweise		38

Bilder

Bild B.1	— Diagramm zur Berechnung des Verdünnungsfaktors zur Herstellung einer konzentrierten Suspension von 10^6 Algen je Milliliter	23
Bild D.1	— Beispiel für einen Testaufbau mit zwei Mikrotiterplatten und Belegung der Wells	31

Tabellen

Tabelle 1	— Synthetisches Meerwasser	10
Tabelle 2	— Nährstoff-Stammlösungen	11
Tabelle A.1	— Herstellung von Verdünnungsreihen – Konzentration des Test- und Kontrollansatzes	18
Tabelle B.1	— Ergebnisse der Prüfungen der Wiederholpräzision	24
Tabelle B.2	— Mittelwerte für $EC(r)_{50}$	26
Tabelle C.1	— Ergebnisse des Ringversuchs	27
Tabelle D.1	— Zusammensetzung der negativen Kontroll- und Testansätze auf 24-Well-Mikrotiterplatten (2 ml Gesamtvolumen)	31
Tabelle D.2	— Volumen für jeden Blindwert	32

Tabelle D.3 — Einstellungen für die Fluoreszenzmessung	33
Tabelle D.4 — Konzentrationsreihe (C) von 3,5-Dichlorphenol, die im Validierungs-Ringversuch verwendet wurde [8]	34
Tabelle D.5 — Wachstumsraten je Tag der Negativkontrollen	36
Tabelle D.6 — Wiederholte und mittlere EC(r)₅₀-Werte und ihre 95 %- Konfidenzintervalle (CI) für 3,5-Dichlorphenol, ermittelt in Tests in Erlenmeyerkolben und 24-Well-Mikrotiterplatten	37

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 10253:2023) 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.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 10253:2016 ersetzen.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 10253:2023 wurde von CEN als prEN ISO 10253:2023 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.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

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

Diese vierte Ausgabe ersetzt die dritte Ausgabe (ISO 10253:2016), die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- in 5.2, Tabelle 2, wurde K_3PO_4 durch K_2HPO_4 in der Stammlösung 3 ersetzt.
- Anhang D wurde um die Beschreibung des marinen Algen-Wachstumshemmtests mit *Phaeodactylum tri-cornutum* in 24-Well-Mikrotiterplatten ergänzt.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung der Wachstumshemmung der einzelligen marinen Algen-Spezies *Skeletonema* sp. und *Phaeodactylum tricornutum* durch im Meerwasser enthaltene Substanzen und Substanzgemische oder durch Umweltwasserproben (Abwasser, Eluate usw.) fest.

Das Verfahren kann für die Untersuchung von leicht wasserlöslichen Substanzen angewendet werden, die durch das Testmedium weder signifikant abgebaut noch in irgendeiner anderen Weise aus diesem eliminiert werden.

ANMERKUNG Mit Änderungen, wie sie in ISO 14442 und ISO 5667-16 beschrieben sind, kann das Verfahren auch zur Bestimmung der Hemmwirkung von schwer wasserlöslichen organischen und anorganischen Stoffen, flüchtigen Verbindungen, Metallverbindungen, Abwässern, Meerwasserproben und Eluat von Sedimenten.

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 Fach-einrichtungen einzuschalten.

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*

ISO 14442, *Water quality — Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten folgende Begriffe.

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

- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

Zelldichte

Anzahl der Zellen je Volumeneinheit Medium

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

3.2

spezifische Wachstumsrate

μ

proportionale Zunahmerate der Zelldichte je Zeiteinheit:

$$\mu = \frac{1}{x} \times \frac{dx}{dt} \text{ (1 je Tag)}$$

Dabei ist

x die Zelldichte, angegeben in Zellen je Milliliter;

t die Zeit, angegeben in Tagen.

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

3.3

Nährmedium

Ansatz aus Meerwasser und Nährstoffen, verwendet für Vorkulturen und Kontrollansätze

3.4

Testmedium

Ansatz aus Meerwasser, Nährstoffen [*Nährmedium* (3.3)] und Prüfmateriel zur Anzucht der Algen

3.5

Testansatz

Ansatz aus Meerwasser, Nährstoffen und Prüfmateriel [*Testmedium* (3.4)], mit Algen angeimpft

3.6

Kontrollansatz

Ansatz aus Meerwasser, Nährstoffen [*Nährmedium* (3.3)] ohne Prüfmateriel, mit Algen angeimpft

3.7

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.

4 Grundlage des Verfahrens

Monospezifische Algenstämme werden über mehrere Generationen in einem festgelegten Medium kultiviert, das verschiedene Konzentrationen des Testgutes enthält, das durch Mischen der entsprechenden Mengen von Nährmedium-Konzentrat, Meerwasser, Stammlösungen des Testgutes und eines Inokulums von exponentiell wachsenden Algenzellen hergestellt wurde. Die Testlösungen werden über eine Dauer von (72 ± 2) h kultiviert, während derer die Zelldichte in jeder Lösung in Abständen von (24 ± 2) h gemessen wird. Die Hemmwirkung wird als Reduktion der spezifischen Wachstumsrate ermittelt, welche mit unter identischen Bedingungen wachsenden Kontrollansätzen verglichen wird.

5 Arbeitsmittel

5.1 Testorganismen

Es ist eine der folgenden marinen Algen zu verwenden:

- a) *Skeletonema* sp.¹ (CCAP 1077/1C, NIVA BAC 1) oder
- b) *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (CCAP 1052/1A, SAG 1090-1a, NIVA BAC 2).

Diese Algen sind in Ästuar- und Küstenregionen wichtige und weit verbreitete Phytoplankton-Spezies (Phylum *Bacillariophyta*).

Die empfohlenen Algen sind als nicht axenische Algen-Reinkulturen bei den folgenden Stammsammlungen erhältlich:

NIVA

Norwegian Institute for Water Research

Gaustadaléen 21

N 0349 Oslo

Norwegen

CCAP

Dunstaffnage Marine Laboratory

P. O. Box 3 Oban

Argyll PA37 1QA

Vereinigtes Königreich

SAG

Experimental Phycology and Culture Collection of Algae at the University of Göttingen (EPSAG)

Nikolausberger Weg 18

37073 Göttingen

Deutschland

Stammkulturen dürfen in dem in 7.1 beschriebenen Medium aufbewahrt werden. Es ist notwendig, regelmäßig Subkulturen anzulegen. Bei *Skeletonema* sp. kann dies wöchentlich erforderlich sein und bei *Phaeodactylum tricornutum* können Intervalle von zwei oder drei Wochen ausreichen. Die Stammkulturen dürfen auch über längere Zeiträume in nährstoffreicheren Nährmedien aufbewahrt werden, wie etwa in den von den entsprechenden Stammsammlungen empfohlenen oder in (neunfach) konzentriertem Nährmedium (Anhang D). Es wird empfohlen, die Stammkultur unmittelbar vor dem Anlegen der Vorkultur für die Tests nach 7.2 in dem unter 7.1 beschriebenen Medium und in einer exponentiellen Wachstumsphase zu halten.

1 In den vorherigen Ausgaben dieses Dokuments wurde die Verwendung zweier Stämme von *Skeletonema costatum* empfohlen. Eine taxonomische Untersuchung der Gattung *Skeletonema* ergab, dass verschiedene Stämme, die ursprünglich als *S. costatum* identifiziert wurden, tatsächlich anderen Spezies angehören könnten. Vor diesem Hintergrund und um bei der Verwendung der zuvor anerkannten Stämme die Kontinuität zu wahren, wurde in dieser überarbeiteten Ausgabe dieses Dokuments die Bezeichnung von *Skeletonema costatum* zu *Skeletonema* sp. geändert, um eine Abweichung von Laboren, die verschiedene Stämme nutzen könnten, zu vermeiden.

ANMERKUNG Konzentrierte Kulturen der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* können ebenfalls mehrere Monate lang aufbewahrt werden, ohne dass sie ihre Lebensfähigkeit verlieren. Die Stammkulturen für die Toxizitätstests können einfach aus den gelagerten konzentrierten Kulturen angelegt werden².

5.2 Reagenzien

5.2.1 Wasser

Wasser, das für die Herstellung des synthetischen Meerwassers, des Nährmediums und der Test-Lösungen verwendet wird, muss deionisiert oder von vergleichbarer Reinheit sein. Insbesondere ist zu vermeiden, dass das Wasser während der Herstellung und Aufbewahrung mit organischen oder anorganischen Stoffen verunreinigt wird. Geräteteile aus Kupfer dürfen nicht verwendet werden.

5.2.2 Synthetisches Meerwasser

Für die Kultivierung und Untersuchung von *Phaeodactylum tricornutum* wird das Nährmedium (7.1) entweder durch Zugabe von Nährstoffen zu natürlichem Meerwasser [Salinität (30 ± 5) g/kg] oder zu synthetischem Meerwasser (Salinität ungefähr 33 g/kg) hergestellt. Bei *Skeletonema* sp. kann für die langfristige Aufbewahrung der Kulturen und auch für das Testmedium die Verwendung von natürlichem Meerwasser erforderlich sein, da synthetisches Meerwasser nicht immer ausreichend Wachstum ermöglicht, um die Qualitätskriterien zu erfüllen. Wird natürliches Meerwasser verwendet, muss sichergestellt werden, dass es nicht verunreinigt ist.

Synthetisches Meerwasser wird nach der in Tabelle 1 angegebenen Zusammensetzung (Salinität ungefähr 33 g/kg) hergestellt. Alle verwendeten Chemikalien müssen von analytischer Reinheit sein.

Tabelle 1 — Synthetisches Meerwasser

Salz	Salzkonzentration in synthetischem Meerwasser g/l
NaCl	22
MgCl ₂ ·6H ₂ O	9,7
Na ₂ SO ₄ (wasserfrei)	3,7
CaCl ₂ (wasserfrei)	1,0
KCl	0,65
NaHCO ₃	0,20
H ₃ BO ₃	0,023

Das Meerwasser (sowohl synthetisches als auch natürliches) ist durch einen 0,45-µm-Membranfilter zu filtrieren, um partikuläres Material und Algen abzuscheiden. Der Salzgehalt des (synthetischen) Meerwassers kann z. B. mit einem Refraktometer gemessen werden.

2 Konzentrierte *Phaeodactylum tricornutum*-Kulturen können durch MicroBioTests Inc. Mariakerke-Gent, Belgien, geliefert werden. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

5.2.3 Nährstoffe

Es sind drei Nährstoff-Stammlösungen in Wasser nach den in Tabelle 2 angegebenen Zusammensetzungen herzustellen.

Tabelle 2 — Nährstoff-Stammlösungen

Nährstoff	Konzentration in der Stammlösung	Endkonzentration im Testmedium
Stammlösung 1		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	48 mg/l	149 µg/l (Fe)
MnCl ₂ ·4H ₂ O	144 mg/l	605 µg/l (Mn)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	45 mg/l	150 µg/l (Zn)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,157 mg/l	0,6 µg/l (Cu)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,404 mg/l	1,5 µg/l (Co)
H ₃ BO ₃	1 140 mg/l	3,0 mg/l (B)
Na ₂ EDTA	1 000 mg/l	15,0 mg/l
Stammlösung 2		
Thiaminhydrochlorid	50 mg/l	25 µg/l
Biotin	0,01 mg/l	0,005 µg/l
Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin)	0,10 mg/l	0,05 µg/l
Stammlösung 3		
K ₂ HPO ₄	2,46g/l	2,46 mg/l; 0,438 mg/l P
NaNO ₃	50,0 g/l	50,0 mg/l; 8,24 mg/l N
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	14,9 g/l	14,9 mg/l; 1,97 mg/l Si

Diese Stammlösungen müssen verdünnt werden (siehe 7.1 und Anhang A), um in den Testlösungen die Nährstoff-Endkonzentration zu erhalten.

Alle verwendeten Chemikalien müssen von analytischer Reinheit sein.

Die Stammlösungen sind durch Filtration durch einen 0,2-µm-Membranfilter zu sterilisieren. Die Stammlösung 1 und Stammlösung 3 dürfen auch durch mindestens 15-minütiges Autoklavieren bei 120 °C sterilisiert werden.

Die Stammlösungen dürfen höchstens zwei Monate lang bei 4 °C in Dunkelheit aufbewahrt werden.

6 Geräte

Laboraausstattung, die mit dem Testmedium in Berührung kommt, muss aus Glas oder einem chemisch inerten Material bestehen.

Es müssen übliche Laborgeräte sowie Folgendes verwendet werden.

6.1 Temperaturkontrollierter Schrank oder Raum, mit weißen Leuchtstofflampen, die eine kontinuierliche gleichmäßige Beleuchtung ermöglichen und gleichzeitig die Anforderungen an die Beleuchtung nach 7.6 erfüllen.

6.2 Gerät zur Messung der Algen-Zelldichte, vorzugsweise ein Partikelzählgerät oder ein Mikroskop mit einer Zählkammer (z. B. Neubauer Zählkammer – Improved).

Alternativ ist das Wachstum der Algenkulturen mit einem indirekten Verfahren, etwa mit einem Fluorometer (z. B. *In-vitro*-Fluoreszenz [4]), zu bestimmen, wenn es empfindlich genug ist und eine ausreichend gute Korrelation mit der Zelldichte erhalten wird. Das verwendete Gerät muss in der Lage sein, geringe Zelldichten im Bereich der Inokulum-Zelldichte zu erfassen und zwischen Algenwachstum und störenden Einflüssen, etwa partikulären Stoffen oder Färbung der Probe, zu unterscheiden.

Anhang D beschreibt ein Verfahren zur Durchführung des Tests in 24-Well-Mikrotiterplatten mit *in-vivo*-Chlorophyll-Fluoreszenz-Bestimmung des Algenwachstums von *Phaeodactylum tricornutum* in einem Mikrotiterplatten-Fluorometer.

Spektralphotometer können empfindlich genug sein, um eine Zelldichte von 10^4 Zellen je Milliliter zu messen, wenn eine ausreichende Küvettenlänge (bis 10 cm) verwendet werden kann. Dieses Verfahren ist gegenüber suspendierten Stoffen und Färbungen bei niedrigen Zelldichten jedoch besonders störanfällig.

Anhang B beschreibt ein Verfahren zur Durchführung der Messungen der Algen-Zelldichte mittels Spektralphotometer.

6.3 Kulturgefäße, z. B. 250-ml-Erlenmeyerkolben mit luftdurchlässigen Stopfen.

6.4 Gerät zur Membranfiltration, mit Filtern mit einer mittleren Porenweite von 0,2 µm und 0,45 µm.

6.5 Autoklav.

6.6 pH-Messgerät.

6.7 Gerät zur Messung der Salinität, z. B. ein Refraktometer.

7 Durchführung

7.1 Herstellung des Nährmediums

Es sind 15 ml der Nährstoff-Stammlösung 1, 0,5 ml der Nährstoff-Stammlösung 2 und 1 ml der Nährstoff-Stammlösung 3 (siehe Tabelle 2) zu etwa 900 ml natürlichem oder synthetischem Meerwasser (5.2.2) hinzugeben; die Lösung ist mit demselben Meerwasser auf 1 l auffüllen.

Der pH-Wert ist mit Salzsäure oder Natriumhydroxid-Lösung auf $8,0 \pm 0,2$ einzustellen.

ANMERKUNG Die Komplexierung von Schwermetallen durch die relativ hohe Konzentration von EDTA im Nährmedium kann die Untersuchung von schwermetallhaltigen Abwässern ausschließen. Siehe ISO 14442 für weitere Anleitungen.

7.2 Herstellung der Vorkultur und des Inokulums

Zwei bis vier Tage vor Beginn des Tests ist eine Vorkultur anzulegen (siehe Anmerkung in 5.1).

Dem Nährmedium (7.1) sind so viele Zellen aus der Algenstammkultur hinzuzufügen, dass in der Vorkultur eine ausreichend geringe Zelldichte erreicht wird, bei drei Tagen der Vorkultivierung beispielsweise 2×10^3 Zellen je Milliliter bis 10^4 Zellen je Milliliter, um bis zu Beginn des Tests ein exponentielles Wachstum aufrechtzuerhalten. Die Vorkultur ist unter denselben Bedingungen wie im Test zu inkubieren. Die Zelldichte in der Vorkultur ist unmittelbar vor Gebrauch zu bestimmen, um das benötigte Volumen an Inokulum zu ermitteln.

7.3 Wahl der Testkonzentrationen

Die Algen sollten den Testkonzentrationen in einer geometrischen Reihe mit einem Verhältnis von höchstens 3,2 exponiert werden (z. B. Verhältnis von 1,8: 1,0 mg/l, 1,8 mg/l, 3,2 mg/l, 5,8 mg/l und 10,4 mg/l).

Die Konzentrationen sollten so gewählt werden, dass mindestens eine Hemmung unterhalb und eine Hemmung oberhalb des vorgesehenen $EC(r)_x$ -Parameters erreicht wird. Zusätzlich sollten mindestens zwei Hemmstufen zwischen 10 % und 90 % aufgenommen werden, um Daten für eine Regressionsanalyse zu erhalten.

ANMERKUNG Ein geeigneter Konzentrationsbereich wird am besten durch einen Vortest bestimmt, der mehrere Größenordnungen der Differenzen zwischen den Testkonzentrationen umfasst. Mehrfachbestimmungen der Testkonzentrationen sind bei diesem Vortest keine Voraussetzung.

7.4 Herstellung der Testsubstanz-Stammlösungen

Durch Lösen der Testsubstanz in dem Nährmedium (7.1) sind Stammlösungen herzustellen. Modifikationen nach den Angaben in ISO 14442 und ISO 5667-16 sind notwendig, wenn die Testsubstanz in dem Testmedium nicht leicht löslich ist.

Werden Wasserproben untersucht (Abwasser, Eluate usw.) ist konzentriertes Nährmedium (nach Anhang A) einzusetzen und, zur Verhinderung einer Wachstumshemmung aufgrund einer zu niedrigen Salinität, gegebenenfalls mit Meerwassersalzen (5.2.2) zu versetzen, um die Salinität der Probe auf das Salinitäts-Niveau des Nährmediums anzuheben. Ein Beispiel für ein Verdünnungsschema für Meerwasserproben ist in Anhang A enthalten.

Üblicherweise wird der Test ohne Einstellen des pH-Werts nach der Zugabe der Testsubstanz durchgeführt. Einige Substanzen können aufgrund hochgradiger Acidität oder Basizität jedoch eine toxische Wirkung verursachen. Um die Toxizität einer Substanz unabhängig von dem pH-Wert zu ermitteln, muss der pH-Wert der Ausgangs-Stammlösung (vor der Verdünnungsreihe) entweder mithilfe von Salzsäure oder Natriumhydroxid-Lösung auf $8,0 \pm 0,2$ eingestellt werden. Die Konzentration der Säure oder Base sollte so gewählt werden, dass die Volumenänderung so gering wie möglich ausfällt.

7.5 Herstellung der Test- und Kontrollansätze

Die Testansätze sind durch Mischen der geeigneten Volumina der Testsubstanz-Stammlösungen (7.4), des Nährmediums (7.1) und des Inokulums (7.2) in den Testgefäßen herzustellen. Das Gesamtvolumen, die Konzentration der Nährstoffe des zugesetzten Nährmediums und die Zelldichte müssen in allen Testansätzen gleich sein.

Die Anfangs-Zelldichte muss ausreichend niedrig sein, so dass während der gesamten Testdauer oder mindestens während der Zeit, die für das Erreichen einer Zunahme der Zelldichte um den Faktor von 16 erforderlich ist, ein exponentielles Wachstum in dem Kontrollansatz möglich ist, ohne dass eine Änderung des pH-Werts von mehr als 1,0 (siehe Abschnitt 8) auftritt. Daher dürfen die Anfangs-Zelldichten nicht mehr als 10^4 Algenzellen je Milliliter betragen.

Aufgrund des höheren Zellenvolumens und der höheren Wachstumsrate wird für die *Skeletonema* sp. eine geringere Anfangs-Zelldichte (um das 3- bis 5-Fache geringer) empfohlen. Bei der Bestimmung der Anfangs-Zelldichte ist die Aggregatbildung von *Skeletonema* sp. zu berücksichtigen.

Für jede Testkonzentration sind mindestens drei Mehrfachbestimmungen vorzubereiten. Sechs weiteren Gefäßen sind lediglich Nährmedium und Inokulum ohne Prüfmateriale hinzuzufügen. Diese Gefäße dienen als Kontrollansätze.

Sofern zutreffend (z. B. bei Umweltproben, gefärbten oder trüben Proben), ist eine Konzentrationsreihe ohne Algen in Gefäßen in einfacher Ausführung herzustellen, die als Hintergrund für die Bestimmung der Zelldichte dient.

Die Testkonzeption darf auf der Grundlage von statistischen Überlegungen geändert werden, um die Anzahl der Konzentrationen zu erhöhen und die Anzahl der Mehrfachbestimmungen je Konzentration herabzusetzen.

Der pH-Wert der Proben für jede Konzentration der Testlösung und der Kontrollansätze ist zu bestimmen.

7.6 Inkubation

Die Testgefäße müssen ausreichend abgedeckt sein, um Kontamination durch die Umgebungsluft zu vermeiden und Wasserverdampfung zu vermindern; sie dürfen jedoch nicht luftdicht abgedeckt sein, so dass CO₂ in die Gefäße gelangen kann. Die Testgefäße sind bei einer Nominal-Temperatur von 20 °C unter kontinuierlichem weißem Licht zu inkubieren. Die Temperaturschwankung darf während des Tests nicht mehr als 2 °C betragen. Die Photonenflussrate Photonenfluenzrate in der mittleren Höhe der Testlösungen muss gleichmäßig sein und in dem Bereich zwischen 60 µmol/m² · s und 120 µmol/m² · s liegen, wenn sie mit einem geeigneten Rezeptor in einem photosynthetisch effektiven Wellenlängenbereich von 400 nm bis 700 nm gemessen wird.

ANMERKUNG 1 Es ist wichtig festzuhalten, dass das Messverfahren, insbesondere der Rezeptortyp (Kollektor), den Messwert beeinflusst. Sphärische Rezeptoren (die auf direktes und reflektiertes Licht aus allen Winkeln oberhalb und unterhalb der Messebene ansprechen) und cosinuskorrigierte Rezeptoren (die auf Licht aus allen Winkeln oberhalb der Messebene ansprechen) werden Rezeptoren, die Licht aus nur einer Richtung empfangen, vorgezogen; sie erzielen bei Mehrpunkt-Lichtquellen des in Anmerkung 2 angegebenen Typs höhere Messwerte.

ANMERKUNG 2 Die vorstehend angegebene Lichtintensität kann mit vier bis sieben Leuchtstofflampen (Nennleistung 30 W) des Typs universalweiß, natürlich, erreicht werden, d.h. mit einer Nennfarbe der Standardfarbe 2 (Farbtemperatur 4 300 K) nach IEC 60081 mit einem Abstand von etwa 0,35 m von der Ebene des Algenkultur-Mediums.

ANMERKUNG 3 Für Lichtmessgeräte, die in lx kalibriert sind, ist für den Test ein äquivalenter Bereich von 3 000 lx bis 6 000 lx annehmbar.

Die Kulturen sind kontinuierlich leicht zu schütteln, um die Zellen in freier Suspension zu halten und um den CO₂-Austausch zwischen Luft und Wasser zu erleichtern und gleichzeitig die Änderung des pH-Werts zu vermindern.

7.7 Messungen

Die Zelldichte ist mindestens alle (24 ± 2) h in jedem Testgefäß (einschließlich der Kontrollansätze) zu messen. Diese Messungen werden üblicherweise an kleinen Volumina vorgenommen, die der Testlösung entnommen und nicht wieder zugeführt werden. Vor der Messung sollten die Testansätze gründlich durchmischt werden.

Der Test muss (72 ± 2) h dauern. Am Ende des Tests ist der pH-Wert jedes Testansatzes (7.5) und der Kontrollansätze (7.5) zu messen. Das Aussehen der Zellen und die Identität der Testorganismen sind mikroskopisch zu bestätigen.

8 Gültigkeitskriterien

Der Test wird als gültig angesehen, wenn folgende Bedingungen eingehalten wurden:

- a) Die Kontroll-Zelldichte muss in 72 h um mehr als den Faktor 16 zugenommen haben. Diese Zunahme entspricht einer spezifischen Wachstumsrate (9.2) von 0,9 je Tag.

ANMERKUNG Die Wachstumsrate der Algen kann unter den festgelegten Bedingungen zwischen den verschiedenen Stämmen derselben Spezies variieren. Ergebnisse aus Ringversuchen zeigen auf, dass bei beiden Spezies üblicherweise Wachstumsraten von mehr als 1,0 je Tag erreicht werden.

- b) Der Variationskoeffizient der spezifischen Wachstumsrate der Kontrollansätze sollte 7 % nicht übersteigen.
- c) Der pH-Wert der Kontrollansätze darf sich während des Tests um nicht mehr als 1,0 erhöht haben.

Schwankungen des pH-Werts während des Tests können das Ergebnis signifikant beeinflussen; deshalb wird eine Grenze von $\pm 1,0$ Einheiten festgelegt. Diese Schwankungen sollten jedoch stets so gering wie möglich gehalten werden, etwa durch kontinuierliches Schütteln während des Tests.

9 Auswertung der Daten

9.1 Auftragen von Wachstumskurven

Die Messwerte der Zelldichte oder anderer Kenngrößen, die mit der Zelldichte in den Testmedien in Verbindung stehen, sind entsprechend der Konzentration der Untersuchungsprobe und dem Zeitpunkt der Messung tabellarisch darzustellen.

Für jede Testkonzentration und für jeden Kontrollansatz ist eine Wachstumskurve als Diagramm des Logarithmus der mittleren Zelldichte gegen die Zeit aufzutragen. Eine lineare Wachstumskurve zeigt exponentielles Wachstum an, wohingegen ein Abflachen der Kurve darauf hindeutet, dass die Kulturen die stationäre Phase erreicht haben.

Wenn die Wachstumsrate der Kontrollansätze gegen Ende der Expositionszeit abnimmt, ist es möglich, dass sich die Werte der gehemmten Kulturen denen der Kontrollansätze nähern, was fälschlicherweise auf eine verminderte Wachstumshemmung hinweist. In diesem Fall sind die Berechnungen der Wachstumsrate und der Wachstumshemmung auf der Grundlage der letzten Messung innerhalb des Zeitraums des exponentiellen Wachstums in den Kontrollansätzen durchzuführen.

9.2 Berechnung der prozentualen Hemmung

Zunächst ist die mittlere spezifische Wachstumsrate μ für jeden Testansatz nach Gleichung (1) zu berechnen:

$$\mu = \frac{\ln N_L - \ln N_0}{t_L - t_0} \quad (1)$$

Dabei ist

t_0 der Zeitpunkt des Beginns des Tests;

t_L der Zeitpunkt der Beendigung des Tests oder der Zeitpunkt der letzten Messung innerhalb des Zeitraums des exponentiellen Wachstums in den Kontrollansätzen (9.1);

N_0 die nominale Anfangszelldichte;

N_L die gemessene Zelldichte zum Zeitpunkt t_L .

Alternativ ist die Wachstumsrate aus der Steigung der Regressionsgeraden zu berechnen, die durch Auftragen des Logarithmus der mittleren Zelldichte gegen die Zeit (9.1) erhalten wird.

Die Mittelwerte von μ für die Kontrollansätze sind zu berechnen. Die prozentuale Hemmung für jedes einzelne Testgefäß ist nach Gleichung (2) zu berechnen:

$$I_{\mu i} = \frac{\bar{\mu}_c - \mu_i}{\bar{\mu}_c} \times 100 \quad (2)$$

Dabei ist

$I_{\mu i}$ die prozentuale Hemmung (Wachstumsrate) für Testgefäß i ;

μ_i die Wachstumsrate für Testgefäß i ;

$\bar{\mu}_c$ die mittlere Wachstumsrate des Kontrollansatzes.

9.3 Bestimmung von $EC(r)_x$

Die Werte für jedes einzelne Testgefäß sind tabellarisch zu erfassen und die prozentuale Hemmung ($I_{\mu i}$) ist gegen die Testkonzentration logarithmisch aufzutragen. Ist die Streuung der Datenpunkte groß, sind die Mittelwerte der Mehrfachbestimmungen mit ihren entsprechenden Standardabweichungen aufzutragen.

Für die experimentell erhaltenen Datenpunkte ist durch Regressionsanalyse (siehe z. B. [5], [6] und [2]) ein geeignetes, nicht lineares Modell anzuwenden, um $EC(r)_x$ -Werte, vorzugsweise mit ihren entsprechenden Vertrauensbereichen, zu bestimmen.

Wenn die Datenmenge nicht ausreicht oder für eine Regressionsanalyse zu unsicher ist oder wenn die Hemmungen keiner regelmäßigen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zu folgen scheinen (z. B. Auftreten von Stimulation), darf ein graphisches Verfahren angewendet werden. In diesem Fall ist eine nach Augenmaß angepasste Konzentrations-Wirkungs-Beziehung aufzutragen; die $EC(r)_x$ -Werte sind von diesem Diagramm abzulesen.

10 Angabe der Ergebnisse

Auf der Wachstumsrate beruhende EC_{10} - und EC_{50} -Werte sind als $EC(r)_{10}$ - und $EC(r)_{50}$ -Werte anzugeben. Ferner ist die Zeitspanne für die Untersuchung deutlich anzugeben, z. B. $EC(r)_{50}$ (0 h bis 72 h). Die $EC(r)_{10}$ - und $EC(r)_{50}$ -Werte werden üblicherweise in Milligramm je Liter (mg/l) oder in Milliliter je Liter (ml/l) oder in % angegeben.

11 Auswertung der Ergebnisse

Die EC_{10} - und EC_{50} -Werte sind toxikologische Werte, die aus einem Laborversuch unter definierten Standardbedingungen abgeleitet werden. Sie weisen auf mögliche Risiken hin, können jedoch nicht zur direkten Vorhersage von Auswirkungen in der natürlichen Umwelt genutzt werden. Bei der Auswertung von EC_{10} - und EC_{50} -Werten ist der Verlauf der Wachstumskurven zu berücksichtigen. Bestimmte Merkmale dieser Kurven (z. B. verzögerter Wachstumsbeginn, gutes Anfangswachstum, das sich nicht fortsetzt) können Hinweise auf die Wirkungsweise der betreffenden toxischen Substanz geben.

12 Untersuchungsbericht

Dieser Untersuchungsbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) Angabe des verwendeten Testverfahrens mit einer Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO/DIS 10253:2022;
- b) alle für die Identifizierung der Untersuchungsprobe erforderlichen Daten, z. B. Angaben zur chemischen Identifizierung der Testsubstanz;
- c) Testorganismus: Spezies, Herkunft, Stammbezeichnung, Art der Kultivierung;
- d) Angaben zum Test:
 - Datum des Beginns und Dauer;
 - Verfahren zur Herstellung der Lösungen;
 - nominale und gemessene Testkonzentrationen;
 - Zusammensetzung des Mediums;
 - Herkunft und Salinität des Meerwassers;
 - Gerät zur Herstellung der Kultur und Art der Inkubation;

- Lichtintensität und -qualität;
- Temperatur im temperaturkontrollierten Klimaschrank oder Inkubator;
- pH-Wert der Test- und Kontrollansätze zu Beginn und am Ende des Tests;
- Verfahren zur Messung der Zelldichte und, wenn zutreffend, Verfahren zur Korrektur der Hintergrundwerte;

e) Ergebnisse:

- Zelldichte in jedem Testgefäß und an jedem Messpunkt;
- mittlere Zelldichte für jede Testkonzentration (und Konzentration des Kontrollansatzes) an jedem Messpunkt;
- Wachstumskurven (Logarithmus der Zelldichte, aufgetragen gegen die Zeit);
- Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (prozentuale Hemmwerte, aufgetragen gegen die Konzentration) in tabellarischer oder graphischer Darstellung: z. B. prozentuale Hemmung in Probits auf der Ordinate gegen die Konzentration auf der logarithmisch skalierten Abszisse;
- $EC(r)_{10}$ -Wert und Art der Bestimmung;
- $EC(r)_{50}$ -Wert und Art der Bestimmung;
- andere beobachtete Effekte;
- falls zutreffend, Ergebnisse von Positiv-Kontrollen, Kontrollkarte.

Anhang A (informativ)

Herstellung von Verdünnungsreihen von Proben in Meerwasser (Abwässer oder Eluate)

A.1 Allgemeines

Wenn Proben in Meerwasser (Abwässer oder Eluate) in Verdünnungsreihen untersucht werden, sollte das natürliche oder synthetische Meerwasser (siehe 5.2.2) als Wasser zur Verdünnung verwendet werden; die zugefügten Nährstoffkonzentrationen sollten in allen Verdünnungen gleich sein und der in 5.2.3 angegebenen endgültigen Testkonzentration entsprechen. Aus diesem Grund wird der Einsatz eines konzentrierten Nährmediums empfohlen.

A.2 Herstellung eines konzentrierten Nährmediums

Es sind 135 ml der Stammlösung 1, 4,5 ml der Stammlösung 2 und 9 ml der Stammlösung 3 zu etwa 700 ml natürlichem oder synthetischem Meerwasser (5.2.2) hinzugeben und mit dem gleichen Meerwasser auf 1 l aufzufüllen.

Der pH-Wert ist durch Hinzugeben von verdünnter Salzsäure oder Natriumhydroxid-Lösung auf $8,0 \pm 0,2$ einzustellen.

A.3 Herstellung einer Verdünnungsreihe der Testmedien

Die Verdünnungsreihe der Testmedien ist nach dem in Tabelle A.1 angegebenen Schema durch Mischen der Volumina des konzentrierten Nährmediums (Abschnitt A.2), des Inokulums (7.2), der Probe (Abwasser oder Eluate) und des Verdünnungswassers (natürliches oder synthetisches Meerwasser, siehe 5.2.2) in den Testgefäßen herzustellen. Das Gesamtvolumen sollte in allen Gefäßen gleich sein.

Weitere Anleitungen bezüglich der Anfangs-Zelldichte und der Testkonzeption sind in 7.5 enthalten.

Tabelle A.1 — Herstellung von Verdünnungsreihen – Konzentration des Test- und Kontrollansatzes

Verdünnung	Verdünnungs- schritt <i>D</i>	Inokulum (7.2) ml	Probe (7.4) ml	Meerwasser (5.2.2) ml	Konzentriertes Nährmedium (A.2) ml	End- volumen ml
1 zu 1,25	1	10	80	—	10	100
1 zu 2	2	10	50	30	10	100
1 zu 3	3	10	33,33	46,67	10	100
1 zu 4	4	10	25	55	10	100
1 zu 5	5	10	20	60	10	100
1 zu 8	8	10	12,5	67,5	10	100
1 zu 12	12	10	8,33	71,67	10	100
1 zu 16	16	10	6,25	73,75	10	100
1 zu 24	24	10	4,17	75,83	10	100